

**VERSUCHE ZUR REINIGUNG UND
CHARAKTERISIERUNG DES HÄMOCYANINS
AUS DER SPINNE CUPIENNIUS SALEI KEYSERLING**

Silke Czichos-Tiedt

1975

VERSUCHE ZUR REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES
HÄMOCYANINS AUS DER SPINNE CUPIENNIUS SALEI KEYSERLING

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt von
Silke Czichos - Tiedt
aus Otterndorf

Mai 1975



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger
- Tag der mündlichen Prüfung: 10.7.75

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen, der durch sein starkes Interesse, seine Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiter danke ich Frau Dr. Kleinschmidt (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) für die Einweisung in die Methode des Edman-Abbaues.

Herzlich bedanken möchte ich mich ferner bei Frau H. Geisert und meinem Mann, die mir bei der Fertigstellung des Manuskriptes sehr geholfen haben, sowie allen Kollegen für die sehr angenehme Zusammenarbeit. Schließlich danke ich auch meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	3
1. Chemikalien	3
2. Tiere und Tierhaltung	4
3. Elektrophoresen	4
a) Elektrophorese in Polyacrylamid	4
b) Anfärbung und Auswertung der Gele	5
c) Reaggregationsversuche	5
d) Isoelektrofokussierung in einem Sucrose-Dichtegradienten	6
e) Trägerfreie Isoelektrofokussierung nach STEGEMANN	6
f) Isoelektrische Fokussierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	7
4. Chromatographische Methoden	7
a) Chromatographie über Controlled-Pore Glass	7
b) Chromatographie über DEAE-Zellulose	8
c) Chromatographie über Sephadex	8
5. Dichtegradientenzentrifugation	9
6. Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge	10
7. Endgruppenbestimmung	12

C. ERGEBNISSE

13

1. Vorversuche zur Isolierung und Handhabung des Hämocyanins aus Cupiennius	13
a) Qualitative Analyse der Hämolympheproteine	13
b) Vergleich von Hämolymphe aus weiblichen und männlichen Tieren	17
c) Einfluß von Dialyse oder EDTA-Zusatz	17
d) Versuche zur "Alterung" des Cupiennius-Hämocyanins	19
2. Darstellung von reinen Hämocyaninkomponenten	20
a) Fällung mit Ammoniumsulfat	20
b) Säulenchromatographie	21
c) Verhalten des Hämocyanins bei Zentrifugation in einem Rohrzuckergradienten	23
d) Auftrennung von Hämocyanin durch präparative Diskelektrophorese	25
e) Auftrennung des Hämocyanins durch Isoelektrofokussierung	27
3. Charakterisierung der reinen Hämocyaninkomponenten	30
a) UV-Spektren der Bande A_1 und A_2	30
b) Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten in der analytischen Ultrazentrifuge	32
c) Demonstration eines Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichtes zwischen A_1 , A_2 und B	35

4. Versuche zur Darstellung der kleinsten funktionellen Untereinheit	38
a) SDS-Gelelektrophorese	38
b) Inkubation mit Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid	40
c) Qualitative Analyse der N-terminalen Aminosäure	41
 D. DISKUSSION	 44
1. Darstellung von chemisch reinem, einheitlichem Hämocyanin	44
2. Physikalische und chemische Charakterisierung der Banden	50
3. Darstellung der kleinsten funktionellen Untereinheit	55
 E. ZUSAMMENFASSUNG	 58
 F. LITERATUR	 61

A. EINLEITUNG

Hämocyane sind die respiratorischen Proteine zahlreicher Arthropoden und Mollusken.

Entsprechend ihrem Vorkommen in diesen zwei großen Tierstämmen findet man auch zwei Typen molekularen Aufbaues. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen das Mollusken-Hämocyanin als einen kurzen Hohlzylinder, der eine Schichtung in maximal zwölf (Busycon) Ringe und eine 5-zählige Symmetrieachse erkennen läßt (VAN BRUGGEN et al., 1963, und FERNANDEZ-MORAN et al., 1966). Diese Moleküle erreichen Gewichte von $9 \cdot 10^6$ Dalton. Die Arthropoden-Hämocyane zeigen dagegen ein anderes Bauprinzip: Sie bestehen aus ungefähr würfelförmigen Partikeln (Sedimentationskonstante ca. 16 S), die zu Dimeren (ca. 24 S) und Tetrameren (ca. 35 S) zusammentreten können. Während im Arthropoden-Hämocyanin die kleinste funktionelle Untereinheit ein Molgewicht von 70 000 Dalton (ca. 5-6 S) aufweist (was bereits aus dem Kupfergehalt hervorgeht), berechnet sich bei dem Mollusken-Hämocyanin die kleinste funktionelle Untereinheit zu 50 000 Dalton. Arthropoden-Hämocyane zerfallen im alkalischen Milieu in die kleinste Untereinheit. Mollusken-Hämocyane konnten dagegen bisher noch nicht ohne Spaltung kovalenter Bindungen soweit zerlegt werden.

Da in der Hämolymphe vieler Tiere das Hämocyanin oft das einzige Protein zu sein scheint und sich zudem nach einer Reihe von Kriterien einheitlich verhält, wurden für sehr viele Untersuchungen dialysierte Hämolymphe oder durch einfache Verfahren grob gereinigtes Hämocyanin verwendet. Das Hämocyanin aus *Helix pomatia* erwies sich aber nach Untersuchungen von BROHULT und BORGMAN (1944) als uneinheitlich. Diese Autoren fanden in der Hämolymphe

von *Helix pomatia* zwei Komponenten, die sich in 1 M NaCl bei pH 5.2 unterschiedlich verhielten. HEIRWEGH et al. (1961) nannten die Komponente des respiratorischen Pigmentes, die bei pH 5.6 und 1.0 M NaCl oder KCl in Halbmoleküle dissoziiert, α -Hämocyanin. β -Hämocyanin dissoziiert bei diesen Bedingungen nicht.

Unterschiedliche Hämocyanine wiesen ROXBY et al. (1974) auch bei dem Krebs *Callinassa californiensis* nach. Aus der Hämolymphe dieses Tieres läßt sich mit 39 S und mit 17 S sedimentierendes Hämocyanin isolieren; während das 39 S-Hämocyanin reversibel dissoziiert, kann das 17 S-Material nicht zur Assoziation zu 39 S-Partikeln gebracht werden.

Die bisherigen Untersuchungen an Arthropoden-Hämocyanin beziehen sich fast ausschließlich auf Krebse und den Xiphosuren *Limulus*. Eine weitere große Arthropodengruppe, die Arachniden, wurde demgegenüber bisher weitgehend vernachlässigt. LOEWE (1972) untersuchte erstmals die Hämocyanine der Spinnen *Cupiennius salei* und *Dugesiella californica*. Sie zeigte, daß Spinnenblut als nahezu einziges Protein Hämocyanin enthält, und daß die Hämocyanine der untersuchten Spinnen dem Typus der Arthropoden-Hämocyanine gut entsprechen: Die funktionelle Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 75-80 000 Dalton und tritt in Aggregaten auf, die in der Ultrazentrifuge mit 16 S, 24 S und 37 S (*Dugesiella*) sedimentieren. Sauerstoffbindung und Dissoziationsverhalten der Aggregate sind in charakteristischer Weise vom pH und anderen Parametern abhängig. Allerdings arbeitete auch LOEWE lediglich mit dialysierter, auf ein definiertes Ionenmilieu eingestellter Hämolymphe. Auf diese

Weise sind physiologische Aussagen möglich; will man die Hämocyane jedoch physikalisch und chemisch charakterisieren, ist Voraussetzung, daß man sich von der Homogenität der Präparationen überzeugt und - falls dieses nicht der Fall ist - chemisch reines, einheitliches Hämocyanin darstellt. Dieses ist das Ziel der vorliegenden Arbeit.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Alle Reagenzien waren von p.A. Qualität. Sie wurden von MERCK bezogen, mit Ausnahme von:

Acrylamid	SCHUCHARDT, München
N, N'-Methylenbisacrylamid	
Imidazol	
Dodecylnatriumsulfat	
Coomassie Brilliant Blue G-250	SERVA, Heidelberg
Guanidiniumhydrochlorid	
DEAE-Zellulose, Typ SS	
Polyäthylenglykol (Carbowax)	
Streptomycinsulfat	
Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung	BOEHRINGER, Mannheim
Controlled-Pore Glass Mesh Size 120/200-80/120	CORNING, New York
Sephadex G-25, G-150, G-200	PHARMACIA, Uppsala, Schweden
Ampholine für die Elektrofokussierung	LKB-PRODUKTER, Bromma, Schweden
Idranal [®] III (Dinatriumsalz der EDTA)	RIEDEL-DE HAËN AG, Seelze-Hannover

2. Tiere und Tierhaltung

Die Haltung von *Cupiennius salei* Keyserling, einer aus Mittelamerika stammenden Kammspinnenart, wurde schon früher beschrieben (MELCHERS, 1963; LOEWE et al., 1970). Die Hämolymphe wurde aus adulten Weibchen gewonnen. Sie wurde wie bei LOEWE (1972) bei 4 °C aus dem dorsal liegenden Herzen entnommen. Sie wurde in einem Zentrifugengläschen von 1.5 ml Volumen gesammelt und die Zellen sofort 15 Min. bei 10.500 rpm abzentrifugiert. Dadurch wurde die Gerinnung weitgehend verhindert.

3. Elektrophoresen

a) Elektrophorese in Polyacrylamid: Für die Elektrophoresen im analytischen Diskelektrophoresesystem (System 6 nach MAURER, 1968) wurden Hämolympheproben von 2 µl eingesetzt. Die Gele waren 5-prozentig (in Vorversuchen 4-8 prozentig), als Elektrodenpuffer diente Diäthylbarbitursäure/Tris, pH 7.0 (0.01 M), als Trenngelpuffer wurde Tris/HCl, pH 7.5 (0.05 M) eingesetzt. Sammelgel wurde nicht verwendet. In ergänzenden Versuchen wurde Phenol zum Elektrodenpuffer zugesetzt und Riboflavin anstelle von Ammoniumperoxodisulfat als Radikalbildner bei der Gelbereitung verwendet. Die Läufe erfolgten bei 3 mA/Gel und Zimmertemperatur. Als kürzeste Laufdauer wurde die Zeit angenommen, in der das Bromphenolblau (als Marker) das Ende der Gelsäule erreicht hatte.

Für Elektrophoresen im präparativen Diskelektrophoresesystem wurden Hämolympheproben von 200 µl-500 µl eingesetzt. Die Elektrophoreseapparatur stammte von der Firma WTW (Weilheim). Es wurden die gleichen Puffer wie oben verwendet. Die Länge der Gelsäule betrug etwa 3 cm,

die Temperatur des Kühlmantels lag bei $+8^{\circ}\text{C}$. Stromstärke und Spannung waren nicht konstant; es wurde aber darauf geachtet, daß die Stromstärke 30 mA nicht überstieg. Ein Gelhaltesieb wurde nicht aufgelegt.

Bei der SDS-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (1969) wurden 4- und 5-prozentige Gele verwendet. Es wurden je 10 μl Spinnenhämolymph inkubiert. Als Eichproteine dienten Aldolase, Albumin, Pyruvatkinase, Eno-lase und Lactatdehydrogenase. Zur Diskelektrophorese unter Zusatz von Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid wurde das gleiche System verwendet.

b) Anfärbung und Auswertung der Gele: Die Banden wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 als Proteinreagenz (BRAMHALL, 1969; WEBER und OSBORN, 1969) oder mit o-Dianisidin, einem Reagenz auf Peroxydase- und Oxydase-aktivität (MANWELL und BAKER, 1963) angefärbt. In einem Versuch wurden Gele mit einer wässrigen Lösung von 3,4-Dihydroxy-phenylalanin (DOPA, 1 mg/ml) angefärbt. Die Gele wurden mit Hilfe einer von der Werkstatt des Instituts gebauten Apparatur densitometrisch ausgewertet. Die Extinktion bei 546 nm wurde von einem log-Schreiber aufgezeichnet und elektronisch integriert.

c) Reaggregationsversuche: 10 μl Cupiennius-Hämolymph wurden auf lange Gelröhrchen (0.6 mal 14.1 cm) aufgetragen und im analytischen Diskelektrophoresesystem getrennt (3 mA/Gel, 3 Std.). Anschließend wurden die Gele mit einer Rasierklinge in Längsrichtung halbiert und jeweils eine Gelhälfte mit Coomassie Blue angefärbt. Nach

der Anfärbung wurden entsprechende Gelabschnitte aus der unbehandelten Gelhälfte herausgeschnitten, in 200 μ l Veronalpuffer (0.01 M, pH 7.0) aufgenommen, homogenisiert, zentrifugiert, die Überstände vereinigt und nach verschiedenen Zeitabständen (1-10 Tage) durch analytische Diskelektrophorese untersucht. Bakterienwachstum wurde durch Zugabe von 0.1-proz. Phenol gehemmt.

d) Isoelektrofokussierung in einem Sucrose-Dichtegradienten: Für diese Versuche wurden 300-500 μ l unbehandelte Cupiennius-Hämolymphe eingesetzt. Die Versuche wurden in der 110 ml-Säule der Firma LKB durchgeführt. Zusammensetzung und Konzentrationen der erforderlichen Lösungen entsprechen den Angaben in der Bedienungsanleitung. Die Fokussierung (Anode oben) erfolgte in einem Sucrose-Dichtegradienten mit 2-proz. Ampholinlösung in einem pH-Bereich von pH 3.5-10. Die Versuche dauerten bei einer Temperatur von 5 °C jeweils zwei Tage. Die angelegte Spannung betrug anfangs 300 V und wurde im weiteren Verlauf auf 500 V erhöht. Nach erfolgter Fokussierung wurden Fraktionen von ca. 2 ml mit einem Fraktionssammler aufgefangen. In jeder Fraktion wurde die Extinktion bei 280 und 340 nm und der pH-Wert bestimmt. Die Fraktionen wurden im analytischen Diskelektrophoresesystem untersucht.

e) Trägerfreie Isoelektrofokussierung nach STEGEMANN: Für diese Versuche wurden 270-300 μ l unbehandelte Cupiennius-Hämolymphe eingesetzt. Die Versuche wurden in einem Polyäthylenschlauch (100 cm und 200 cm Länge, 4 mm i.d.) durchgeführt. Zusammensetzung und Konzentrationen

der erforderlichen Lösungen entsprechen den Angaben von MACKO und STEGEMANN (1970). Die Fokussierung erfolgte in einer 10-proz. Sucroslösung enthaltend 1 % Ampholine in einem pH-Bereich von pH 4-6. Die Versuche dauerten bei einer Temperatur von 3.5 °C drei und elf Tage. Die angelegte Spannung betrug anfangs 600 V und wurde im weiteren Verlauf auf 1000 V erhöht. Nach erfolgter Fokussierung wurde der Schlauch in flüssigem Stickstoff schnell abgekühlt und an zuvor markierten Stellen (alle 2.5 bzw. 5 cm) in einzelne Schlauchstücke geschnitten. In jeder Fraktion wurde die Extinktion bei 280 und 340 nm und der pH-Wert bestimmt. Die Fraktionen wurden im analytischen Diskelektrophoresesystem untersucht.

f) Isoelektrische Fokussierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen: Für diese Versuche wurden je 2 µl Cupiennius-Hämolymphe eingesetzt. Die Versuche wurden in kurzen Glasröhrchen (0.5 mal 7.5 cm) durchgeführt. Zusammensetzung und Konzentrationen der erforderlichen Lösungen entsprechen den Angaben von GAINER (1973). Die Fokussierung erfolgte in einem pH-Bereich von pH 3-6. Die Versuche dauerten bei Zimmertemperatur 3¹/₂ Stunden. Die angelegte Spannung betrug 120 V. Nach erfolgter Fokussierung wurden die nicht angefärbten Gele in 5-mm-Segmente geschnitten und jedes dieser Segmente in 1 ml H₂O dest. über Nacht belassen. Anschließend wurde der pH-Wert bestimmt.

4. Chromatographische Methoden

a) Chromatographie über Controlled-Pore Glass: 150-400 µl Hämolymphe (in einigen Versuchen dialysiert gegen 0.05 M

Glycin/NaOH, pH 9.5) wurde auf Säulen von 0.9 x 60 cm und 1.0 x 90 cm aufgetragen. Äquibriert und eluiert wurde mit Diäthylbarbitursäure/Tris, Na/K-Phosphatpuffer (beide pH 7.0) und Tris/HCl pH 9.5. Alle Puffer waren 0.05 M. Der Proteingehalt wurde im Durchflußphotometer registriert und die Fraktionen (Volumen ca. 3 ml) im analytischen Diskelektrophoresesystem untersucht. Durch Vorbehandlung des Porenglases mit Carbowax 20M (CORNING PRODUCT INFORMATION) sollten schwache, negative Oberflächenladungen des Porenglases abgedeckt werden.

b) Chromatographie über DEAE-Zellulose: Die Zellulose wurde zunächst gewaschen (PETERSON und SOBER, 1962) und in Säulen gefüllt (1.5 x 30 cm). Sie wurden mit 0.05 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 7.9 äquibriert (KERR, 1970). Anschließend wurde Hämolymphe aufgetragen und mit einem NaCl-Stufengradienten in Ammoniumhydrogencarbonat eluiert (0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 und 0.50 M NaCl in Ammoniumhydrogencarbonat 0.05 M, pH 7.9). Der Proteingehalt des Eluats wurde im Durchflußphotometer registriert und die einzelnen Fraktionen (Volumen ca. 3 ml) im analytischen Diskelektrophoresesystem untersucht.

c) Chromatographie über Sephadex: 300 µl Hämolymphe wurden auf eine Säule (0.9 x 60 cm), gefüllt mit Sephadex Gel G-200, aufgetragen. Das Gel war bei 95 °C in 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.0 gequollen. Anschließend wurde mit dem gleichen Puffer eluiert und das Eluat wie oben untersucht.

In weiteren Versuchen wurden die zwei, nach Isoelektro-

fokussierung von A_2 erhaltenen Maxima über Sephadex Gel G-150 getrennt. Das Gel wurde mit Na-Bicarbonatpuffer, Ionenstärke 0.1, pH 10.1, äquilibriert und mit dem gleichen Puffer eluiert. Das Eluat wurde in der analytischen Ultrazentrifuge und im analytischen Diskelektrophoresesystem untersucht.

5. Dichtegradientenzentrifugation

Zur Vorreinigung des Hämocyansins wurden 250 μ l-Proben unverdünnter Cupiennius-Hämolymphe 8 Std. bei 49.000 rpm und 4 °C in 0.05 M Tris/HCl Puffer pH 7.0 zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen und das blau gefärbte Hämocyaninpellet in 0.2 ml 20 % Sacharose aufgenommen.

Die präparative Dichtegradientenzentrifugation erfolgte in der präparativen Ultrazentrifuge Typ L-2 (Beckman Instruments) in einem Gradienten von 0.4 M bis 1.0 M Sacharoselösung in 0.05 M Tris/HCl Puffer, pH 7.0. 100 μ l-Proben von Cupiennius-Hämolymphe wurden vorsichtig aufgetragen und diese Proben für 4, 8, 13, 18 und 23 Stunden bei 40.000 rpm und 4 °C im Rotor SW 39 bzw. für 4 Stunden bei 39.500 rpm und 4 °C im Rotor SW 41 zentrifugiert. Die Cellulosenitratröhrchen wurden am Boden punktiert und etwa 13 Fraktionen (eine Fraktion = 5 Tropfen) gesammelt. Ihre Extinktion bei 280 und 340 nm wurde gemessen; anschließend wurden sie durch analytische Diskoelektrophorese untersucht. Aus den Polyallomerröhrchen des Rotors SW 41 wurden 400 μ l-Fraktionen abpipettiert.

6. Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge

Für die Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge wurden 200 μ l der Eluate aus Polyacrylamidgelen (siehe Reaggregationsversuche S.7) verwendet.

In weiteren Versuchen wurden 100-500 μ l Fraktionen nach Isoelektrofokussierung zwei Tage lang gegen Na-Bicarbonatpuffer, Ionenstärke 0.1, pH 10.1, dialysiert. Anschließend wurden die Sedimentationskoeffizienten der auftretenden Komponenten bestimmt.

Die Läufe wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge, Model E, der Firma Beckman Instruments, ausgerüstet mit einem photoelektrischen Scanner und Multiplexer, durchgeführt.* Es wurden Doppelsektorzellen mit Kel F-Mittelstücken verwendet. Alle Läufe erfolgten bei 20 °C und 40 000 bzw. 44 000 Upm. Die Absorption bei 280 nm wurde registriert.

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte nach dem üblichen graphischen Verfahren (ELIAS, 1969) aus der Gleichung:

$$(s_c)_{app} = \frac{2.303}{\omega^2} \cdot \frac{\Delta \log r}{\Delta t}$$

Aus den apparenten Sedimentationskoeffizienten kann durch Multiplikation mit drei Korrekturfaktoren die Sedimentationskonstante $s_{20,w}^c$ berechnet werden:

$$(s_{20,w})_c = (s_{t,LM})_c \cdot \frac{\eta_{t,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{t,Lsg}}{\eta_{t,w}} \cdot \frac{(1 - v_{20,w} \cdot \int_{20,w})}{(1 - v_{t,LM} \cdot \int_{t,Lsg})}$$

In dieser Gleichung bedeuten:

$(s_{20,w})_c$ = Sedimentationskoeffizient unter Standardbedingungen (20°C und Wasser) bei der Konzentration c

* Die technische Durchführung übernahmen freundlicherweise Frau Dr. R. Loewe und Herr R. Schmid.

$(s_{t,LM})_c$ = Sedimentationskoeffizient unter Meßbedingungen
(t °C, Lösungsmittel LM, Konzentration c)

$\eta_{t,w}$ = Viskosität des Wassers bei der Temperatur t °C

$\eta_{20,w}$ = Viskosität des Wassers bei 20 °C

$\eta_{t,Lsg}$ = Viskosität der Lösung bei t °C

$V_{20,w}$ = partielles spezifisches Volumen des Gelösten
bei 20 °C in Wasser

$V_{t,LM}$ = partielles spezifisches Volumen des Gelösten
bei t °C im Lösungsmittel

$\rho_{20,w}$ = Dichte des Wassers bei 20 °C

$\rho_{t,Lsg}$ = Dichte der Lösung bei t °C

Auf eine Umrechnung der apparenten Sedimentationskoeffizienten in die Sedimentationskonstanten wurde aus folgenden Gründen verzichtet: Es ist wahrscheinlich, daß die gefundenen Koeffizienten der Sedimentationskonstante sehr nahe kommen, da die Läufe bei der Standardtemperatur von 20 °C durchgeführt wurden (dadurch wird der zweite Korrekturfaktor gleich 1) und die verwendeten Puffer niedrige Molaritäten (0.01-0.1 M) aufwiesen. Dadurch dürfte der erste Korrekturfaktor gleich 1 sein. Das Gleiche gilt für den dritten Korrekturfaktor.

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten nach Dichtegradientenzentrifugation in der präparativen Ultrazentrifuge erfolgte aus der Gleichung:

$$s = \frac{dr_o}{dt} \cdot \frac{10^{13}}{60\omega^2 r_o} = \frac{2.303 \cdot 10^{13}}{60\omega^2} \cdot \frac{\log r_o - \log r_m}{t}$$

r_o = Abstand vom Rotationszentrum zum Maximum der Bande

r_m = Abstand vom Rotationszentrum zum ursprünglichen Meniskus

Aus dem Sedimentationskoeffizienten s kann nach der Gleichung:

$$s_{20,w} = A \cdot \frac{\eta_{0,t}}{1 - v_{0,t}^p} \cdot \frac{10^{13}}{60 \omega^2 r_0} \cdot \frac{dr_0}{dt}$$

die Sedimentationskonstante $s_{20,w}$ berechnet werden, wobei

$$A = \frac{1 - v_{20,w}^p}{\eta_{20,w}} = \text{konstant},$$

da das partielle spezifische Volumen relativ wenig temperaturabhängig ist.

7. Endgruppenbestimmung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure wurde zunächst durch Reaktion mit 5-Dimethylaminonaphtalinsulfonsäure-(1)-chlorid nach GRAY (1967) versucht. Dazu wurde durch präparative Diskelektrophorese gereinigtes Hämocyanin (Bande A₁, 0.74 mg pro Ansatz, entsprechend 9.8 nMole der funktionellen Untereinheit vom Molgewicht 75 000) bei 37 °C für eine Stunde mit Dansylchlorid inkubiert. Aufarbeitung, Hydrolyse und die darauf folgenden Schritte wurden genau nach den Angaben von GRAY durchgeführt (die Extraktion mit Äthylacetat wurde meist weggelassen). Aufsteigende Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgel (20 x 20 cm) in folgenden Systemen durchgeführt: 1. Benzol/Pyridin/CH₃COOH (4:1:1), 2. n-Butanol, gesättigt mit 0.2 N NaOH, 3. Chloroform/Äthanol/CH₃COOH (38:4:3), 4. Chloroform/Benzylalkohol/CH₃COOH (70:30:3), 5. Chloroform/tert. Butanol/CH₃COOH (6:3:1).

Die endgültige qualitative Analyse der N-terminalen Aminosäure geschah durch Anwendung der Phenylisothio-

cyanat-Methode nach EDMAN (1950). Dazu wurde durch Isoelektrofokussierung gereinigtes Hämocyanin (Bande A₁, 2.7 mg pro Ansatz, entsprechend 40 nMole der funktionellen Untereinheit vom Molgewicht 75 000; Bande A₂, 1.9 mg pro Ansatz, entsprechend 25 nMole der funktionellen Untereinheit vom Molgewicht 75 000; Gesamthämolymphe, 15 mg pro Ansatz) gegen Na/K-Phosphatpuffer (I = 0.1, pH 7.4) über Nacht dialysiert und in alkalischer Lösung mit Phenylisothiocyanat umgesetzt. Anlagerung von Phenylisothiocyanat an die freie α -Aminogruppe des Peptids, zyklisierende Spaltung unter stark sauren Bedingungen (100 μ l Trifluoressigsäure) und Konversion des trockenen Thiazolinons zu dem Phenylthiohydantoinderivat der N-terminalen Aminosäure geschahen nach EDMAN (1950). Die PTH-Aminosäuren wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (10 x 10 cm) mit Fluoreszenzindikator identifiziert. Aufsteigende Dünnschichtchromatographie wurde nacheinander in folgenden Systemen durchgeführt: 1. System: Propionsäurebutylester (tert.). 2. System: Äthylenchlorid/Essigsäure (15:2).

C. E R G E B N I S S E

1. Vorversuche zur Isolierung und Handhabung des Hämocyanins aus Cupiennius

a) Qualitative Analyse der Hämolympheproteine: LOEWE (1972)

gibt einen prozentualen Kupfergehalt im Gesamtprotein von Cupiennius-Hämolymphe von 0.12 % an. Dieser Wert liegt sehr viel niedriger als die Werte (0.15-0.18 %), die bei gereinigten Hämocyaninen anderer Arthropoden gefunden wurden (PROSSER und BROWN, 1961) und läßt ver-

muten, daß Cupiennius-Hämolymphe neben dem Hämocyanin noch weitere Proteine enthält.

Um dieses zu prüfen, wurden die Hämolympheproteine zunächst mit Hilfe der analytischen Diskelektrophorese in Polyacrylamid analysiert. Unter verschiedenen Elektrodenpuffern unterschiedlichen pH-Wertes und unterschiedlicher Ionenzusammensetzung ergab 0.01 M Veronal/Tris-Puffer, pH 7.0, als Elektrodenpuffer die beste Auftrennung. Die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue (BRAMHALL et al., 1969) zeigt ein charakteristisches Bandenmuster (Abb. 1).

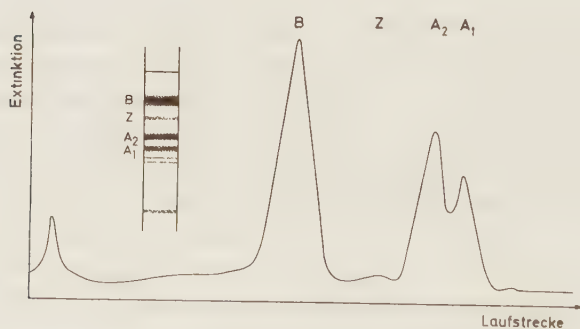


Abb. 1: Diskelektrophorese der Hämolympheproteine von Cupiennius; 5-proz. Gel, System 6 aus MAURER (1968), 3 mA/Gel, 60 Min..

Es besteht aus einer vorausseilenden Komponente, die auf der Höhe des Bromphenolblau liegt (ca. 3 % des Gesamtproteins) und aus drei intensiv gefärbten Banden, von denen zwei dicht beieinander liegen. Die Hauptbanden

werden als A_1 , A_2 und B bezeichnet. Ihr Anteil am Gesamtprotein beträgt: Bande A_1 21 %, Bande A_2 23 % und Bande B 47 %. Der Rest des Hämolympheproteins verteilt sich auf hochmolekulares Protein, das am Kopf des Geles liegen bleibt (fast 6 % des Gesamtproteins), eine Bande "Z", die zwischen Bande B und den A-Banden liegt und bei Elektrophorese unbehandelter Hämolymphe nur sehr schwach repräsentiert ist, und auf zwei sehr schwache Banden, die schneller als die A-Banden laufen. Die Anfärbung mit o-Dianisidin, einem Reagenz auf Peroxydase- und Oxydaseaktivität (MANWELL und BAKER, 1963), verlief für die drei Hauptbanden positiv. Bei ihnen handelt es sich also mit großer Wahrscheinlichkeit um Hämocyanin. Während sich zwischen B und den A-Banden stets ein größerer Abstand findet, liegen die Banden A_1 und A_2 sehr nahe, normalerweise nur 0,5-1mm auseinander. Bei dreistündiger Elektrophorese (400-500 V) in langen Röhrchen lassen sie sich jedoch gut voneinander trennen; ihr Abstand beträgt bis 2 mm.

Auch bei Verwendung von 0.01 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.0, und 0.05 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7.9, als Elektrodenpuffer wird das charakteristische Bandenmuster beobachtet, obwohl die Wanderungsgeschwindigkeit in diesen Systemen nur sehr gering ist. Die Doppelbande A stellt also mit großer Wahrscheinlichkeit kein Artefakt dar, das durch Veronal/Tris als Elektrodenpuffer hervorgerufen wird.

Eine Doppelbande A zeigt sich unter UV-Licht auch nach Umsetzung mit ANS (8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure, HARTMAN und UDENFRIEND, 1969). Das Auftreten der Doppelbande ist also auch kein Färbungsartefakt.

Das Auftreten zweier Hämocyaninbanden A_1 und A_2 läßt

sich weiterhin durch Reelektrophorese sichern. Werden A_1 und A_2 einzeln ausgeschnitten und erneut elektrophoretisch getrennt, so wandern sie mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (12 Versuche, je Versuch 2-4 identische Proben; Abb. 2).

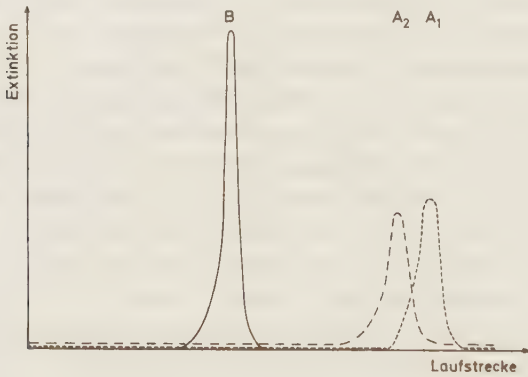


Abb. 2: Reelektrophorese der isolierten Banden B, A_1 und A_2 von Cupiennius-Hämocyanin; 5-proz. Gel, ²System 6 aus MAURER (1968), 3 mA/Gel, 60 Min..

Werden allerdings A_1 und A_2 gemeinsam ausgeschnitten und eluiert, wird bei Reelektrophorese nur eine Bande sichtbar (2 Versuche, je Versuch 2 identische Proben). Ob dieses ein zufälliges Ergebnis darstellt, sei dahingestellt; es spielt für die weitere Arbeit keine Rolle.

Nach MILLOT (1926) enthält die Hämolymphe verschiedener Spinnen Tyrosinase. Zur Nachprüfung wurden Gelröhrchen unter geeigneten Bedingungen mit DOPA inkubiert. Die Anfärbung zeigt im Bereich der Hämocyaninbanden keine Tyrosinaseaktivität. Dagegen wird eine schwache Bande angefärbt, die langsamer als die Hämocyanine läuft.

b) Vergleich von Hämolymphe aus weiblichen und männlichen Tieren: Weitere Versuche betrafen die Frage eines möglichen Geschlechtsunterschiedes im Vorkommen der Hämocyanine und ihrem charakteristischen Bandenmuster. HORN und KERR (1969) fanden bei dem Krebs *Callinectes sapidus* (Blue Crab) ein sogenanntes "langsames Hämocyanin" nahezu ausschließlich in der Hämolymphe von Weibchen. Außerdem fanden sie in Weibchen mit reifenden Oocyten ein sogenanntes "high density"-Lipoprotein. In der Hämolymphe von adulten *Cupiennius*-Weibchen und -Männchen wurde dagegen kein Unterschied im Bandenmuster festgestellt. Hämolymphe aus *Cupiennius*-Weibchen, die befruchtet waren und bereits einen Kokon bildeten, zeigte bei analytischer Diskelektrophorese keine zusätzlichen Banden. Hämolymphe aus befruchteten Spinnenweibchen kurz vor Kokonbildung zeigt bei analytischer Diskelektrophorese ebenfalls nur das charakteristische, bekannte Bandenmuster.

c) Einfluß von Dialyse oder EDTA-Zusatz: Um zu prüfen, ob für die Ausbildung des Bandenmusters die Ionenzusammensetzung der Hämolymphe mit verantwortlich ist, wurden Proben vor der Elektrophorese erschöpfend dialysiert. Bei einem Vergleich zwischen gegen Veronalpuffer (0.01 M, pH 7.0) dialysierter und nicht dialysierter Hämolymphe war in der dialysierten Probe die Bande "Z", die im Vergleich kaum wahrnehmbar ist und zwischen der A- und der B-Gruppe läuft, um ein Geringes verstärkt. Ihr Anteil am Gesamtprotein ist dann 3 %.

Aus verschiedenen Arbeiten (BROSTEAUX, 1937; VAN HOLDE und COHEN, 1965; WITTERS und LONTIE, 1968; ELLERTON et al., 1970) kennt man den stabilisierenden Einfluß von Erdalkalitionen auf die Quartärstruktur des Hämocyanins.

Deswegen wurde gegen 0.01 M Veronal, pH 7.0, unter Zusatz von EDTA (5 mM, 10 mM oder 100 mM) 24 Stunden dialysiert. Bei anschließender analytischer Diskelektrophorese wurde das gleiche Bandenmuster wie für dialysierte Hämolymphe ohne Zusatz von EDTA gefunden. Die Zugabe von EDTA bewirkt jedoch keine signifikante Verschiebung der Anteile der einzelnen Hämocyaninkomponenten (Abb. 3 und Tabelle 1).

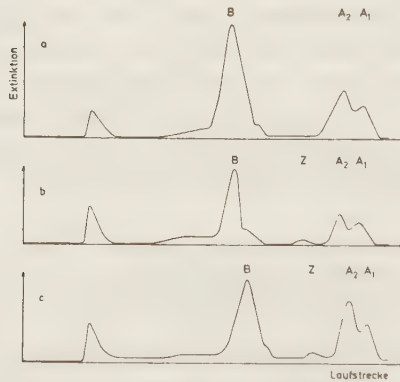


Abb. 3: Diskelektrophorese der Hämolympheproteine von *Cupiennius* unter Zusatz von EDTA; 5-proz. Gel, Tris/HCl-Puffer, pH 7.0, 4 mA/Gel, 60 Min..
a) mit 100 mM EDTA;
b) mit 10 mM EDTA;
c) mit 5 mM EDTA.

Tabelle 1: Abhängigkeit des prozentualen Anteils der Banden B, Z, A₁ und A₂ am Gesamtprotein von der EDTA Konzentration.

EDTA	B	Z	A ₂	A ₁
-	47 %	3 %	26 %	24 %
5 mM	47 %	2 %	26 %	25 %
10 mM	36 %	8 %	28 %	28 %
100 mM	39 %	-	28 %	33 %

d) Versuche zur "Alterung" des Cupiennius-Hämocyanins:

Befunde verschiedener Autoren zeigen, daß Hämocyanine bei längerer Aufbewahrung Veränderungen unterworfen sind, die als "Alterung" bezeichnet werden. LAMY et al. (1970) beobachteten bei dem Hämocyanin der Skorpione *Androctonus australis* (L.) und *Androctonus mauretanicus* (Pocock) eine quantitative Verschiebung der einzelnen Banden, wenn die Hämolymphe wiederholt eingefroren und aufgetaut wurde.

Entsprechende Versuche wurden an Cupiennius-Hämolymphe vorgenommen. Bei Aufbewahrung der Hämolymphe unter Luft bei -17 °C hat wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe (10 mal, über 6 Tage) keinen Einfluß auf die elektrophoretische Wanderung des Hämocyanins. Man ist also für weitere Untersuchungen nicht unbedingt auf frisches Material angewiesen.

Helix pomatia-Hämocyanin unterliegt bei Aufbewahrung einem Alterungsprozeß, der in einer Abnahme der Extinktion bei 346 nm besteht (DE LEY und LONTIE, 1970). Ent-

sprechende Versuche wurden mit dem Hämocyanin aus Cupiennius durchgeführt. Eine Hämocyaninlösung (24 mg/ml, 0.05 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.0) wurde an Luft bei -17°C im Dunkeln aufbewahrt. Anfangs jede Woche, später jeden Monat wurde die Extinktion bei 346 nm gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 4).

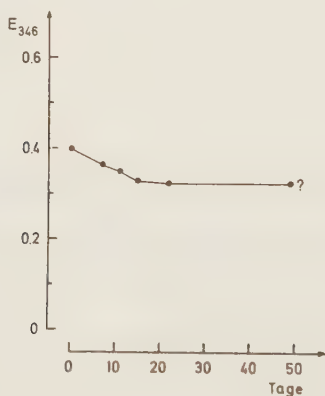


Abb. 4: Änderung der Extinktion bei 346 nm mit der Zeit von Hämocyanin aus Cupiennius (50 μ l Hämolymphe + 1 ml Puffer).

Zur Verhinderung von Bakterienwachstum wurde Streptomycinsulfat (50 mg/ml) zugegeben. Die Extinktion nimmt nur langsam von 0.4 auf 0.325 ab.

2. Darstellung von reinen Hämocyaninkomponenten

a) Fällung mit Ammoniumsulfat: Während bei 30-proz. Sättigung einer Hämocyaninlösung mit Ammoniumsulfat

noch alles Protein in Lösung ist, fällt bei 50-proz. Sättigung von Cupiennius-Hämolymphe mit Ammoniumsulfat das meiste Hämocyanin aus. Bei Diskelektrophorese wird das charakteristische Bandenmuster gefunden. Bei 70- und 90-proz. Sättigung werden noch 27 und 19 % der B-Bande (bezogen auf die gesamte Menge an B im Überstand und Rückstand) im Überstand wiedergefunden.

b) Säulenchromatographie: Bei Chromatographie über Controlled-Pore Glass (HALLER, 1965) mit einer Ausschußgrenze von 1.2×10^6 Dalton ergibt sich ein Kurvenverlauf, bei welchem zwei Gipfel ineinander übergehen. Auch durch Vorbehandlung des Porenglases mit Carbowax 20 M (zur Vermeidung unspezifischer Adsorption) und durch Verwendung anderer Puffer wird keine Auftrennung in distinkte Banden erzielt. In der analytischen Disk-elektrophorese läßt sich in jeder Fraktion des Maximums das vollständige Bandenmuster der Hämolymphe nachweisen. Die 16 S- und 24 S-Komponenten (entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 450 000 und 900 000 Dalton) lassen sich also nach dem umgekehrten Molekularsiebprinzip nicht trennen. Es bleibt zu klären, ob dieses auf rascher Geschwindigkeitseinstellung beruht oder andere Gründe hat.

Wenn die Hämolymphe 24 Stunden gegen 0.05 M Glykokoll/NaOH, pH 9.5, dialysiert wird, sollten nach LOEWE (1972) nebeneinander 16 S- (26 %) und 5 S-Hämocyanin (73 %) vorliegen. Bei Chromatographie über CPG wurde in diesem Falle ein eingipfeliges Kurvenverlauf mit einer vorge-lagerten Schulter erhalten. Zur Analyse der Fraktionen wurde bei diesen Versuchen der Glykokollpuffer gegen

Phosphatpuffer, 0.05 M, pH 7.0, ausgetauscht. Dieses wurde durch Filtration über Sephadex G-25 erreicht. Die Analyse zeigte eindeutig, daß keine chromatographische Trennung erfolgt war.

Bei Chromatographie über Sephadex G-200 wird das gesamte Protein in einem breiten Maximum gefunden, lediglich die schwache, in der Diskelektrophorese vorausseilende Proteinbande fehlt; bei ihr handelt es sich nach dem Ergebnis der Anfärbung mit o-Dianisidin wahrscheinlich nicht um Hämocyanin.

Schließlich wurde Hämocyanin aus Cupiennius auch über DEAE-Cellulose chromatographiert. KERR (1970) wendete zur Trennung von Hämocyaninen und anderen Proteinen aus Crustaceen einen Salzgradienten (0-0.5 M NaCl in Ammoniumhydrogencarbonat) an. Dieses System wurde auch auf die Abtrennung von Cupiennius-Hämocyanin angewandt. Die kontinuierliche Registrierung der Extinktion mit dem Durchflußphotometer zeigt nur zwei sehr kleine Gipfel, deren Analyse durch Diskelektrophorese keine distinkten Banden ergab. Darauf wurde ein NaCl-Stufengradient in Ammoniumhydrogencarbonat eingesetzt. Das meiste Protein wurde bei 0.2 M NaCl Konzentration eluiert. Die in der Diskelektrophorese vorausseilende Proteinbande erscheint bei 0.3 M NaCl. Das Protein im Hauptgipfel ergab bei analytischer Diskelektrophorese das bereits bekannte Bandenmuster. Es läßt sich also durch Anwendung eines NaCl-Stufengradienten höchstens das vorausseilende Fremdprotein abtrennen, während die Hämocyaninbanden anscheinend zu geringe Ladungsunterschiede aufweisen, um sich an einem Ionenaustauscher aufzutrennen.

c) Verhalten des Hämocyanins bei Zentrifugation in einem Rohrzuckergradienten: ELLERTON et al. (1970) konnten durch Zentrifugation in einem Rohrzuckergradienten die 25 S- und 18 S-Komponenten des Hämocyanins aus *Cancer magister* partiell voneinander trennen. Um das Verhalten des Hämocyanins aus *Cupiennius* im Rohrzuckergradienten zu prüfen, wurden Proben in einem Gradienten von 0.4-1.0 M Sacharose in Tris/HCl, 0.05 M, pH 7.0, über 4, 8, 13, 18 und 23 Stunden im Rotor SW 39 zentrifugiert. 4 Stunden reichen bereits aus, um eine Auftrennung in Banden zu erzielen. Der Extinktionsverlauf, gemessen bei 280 und 340 nm, zeigt zwei Maxima, die sich in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer verschieben. In späteren Läufen zeigte der Extinktionsverlauf jedoch nur noch ein Maximum. Dieses kann auf einer unterschiedlichen Behandlung des Gradienten beruhen. Zur Glättung des Gradienten wurde dieser über Nacht im Kältelabor aufbewahrt. Bei den ersten Versuchen wurde die Zentrifugation 1-2 Stunden nach Herstellung des Gradienten gestartet.

Durch Zentrifugation in den längeren Röhrchen des Rotors SW 41 und anschließender Rezentrifugation im gleichen Gradienten läßt sich eine Bande isolieren, die mit B identisch ist. Sie tritt in den Fraktionen 16-20 auf (die Fraktionen 13-15 wurden in der analytischen Disk-elektrophorese nicht überprüft). In den folgenden Fraktionen werden zusätzlich die Banden A₁ und A₂ gefunden. In den obersten Fraktionen der Röhrchen wird schließlich die "vorausseilende" Bande nachgewiesen (Abb. 5 und 6).

Abb. 5:

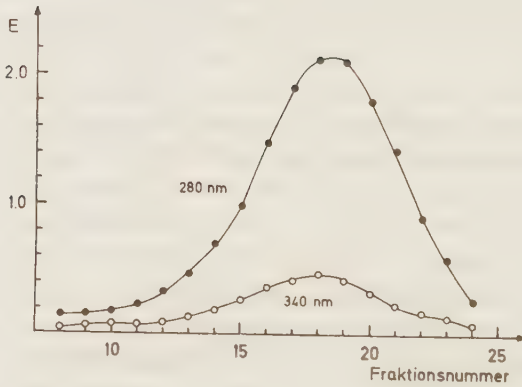


Abb. 5:

Extinktionsverlauf bei 280 und 340 nm in den Fraktionen nach Zentrifugation der Hämolympheproteine von Cupiennius in einem Rohruckergradienten; Probe: 0.1 ml, 0.4-1.0 M Sacharose, Tris/HCl-Puffer, pH 7.0, 39.500 rpm, 4 °C, 4 Std..

Abb. 6:

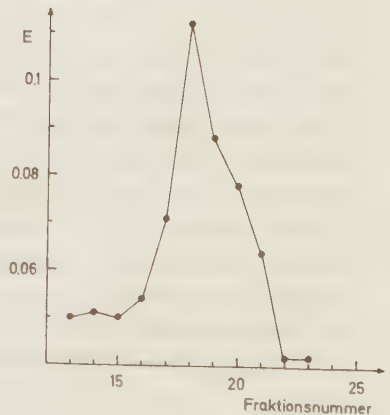


Abb. 6:

Extinktionsverlauf bei 280 nm in den Fraktionen nach Rezentrifugation der vereinigten Fraktionen 17, 18 und 19 (siehe Abb. 5) in einem Rohruckergradienten; Probe: 0.2 ml, 0.4-1.0 M Sacharose, Tris/HCl-Puffer, pH 7.0, 39.500 rpm, 4 °C, 4 Std..



Durch Zentrifugation im Rohrzuckergradienten läßt sich also erwartungsgemäß die Bande B von den A-Banden trennen, welche aufgrund ihres Verhaltens in der Polyacrylamidelektrophorese ein sehr viel geringeres Molekulargewicht haben sollten. Um die Banden A₁ und A₂ voneinander trennen zu können, ist die Anwendung anderer Prinzipien erforderlich.

d) Auftrennung von Hämocyanin durch präparative Disk-elektrophorese: Die elektrophoretische Auftrennung von Substanzgemischen in Acrylamidgel führt unter Ausnutzung der "Molekularsieb-Eigenschaften" solcher Gele zu scharfer Fraktionierung. Eine höhere Trennschärfe wird durch "Konzentrierungseffekte" erreicht, welche auf Diskontinuitäten von Porengrößen und pH-Werten innerhalb der Trennsäule beruhen.

Auf der Grundlage dieser Methode entwickelte STRAUCH (1970) eine Diskelektrophoreseapparatur, welche im präparativen Maßstab arbeitet. Diese Apparatur wurde zur Auftrennung von Hämocyanin verwendet. Bei analytischer Diskelektrophorese der gewonnenen Fraktionen wurde in den Fraktionen 13 bis 17 eine scharfe Bande gefunden, die A₁ entspricht (Abb. 7). Es folgt eine Anzahl von Fraktionen mit A₁ und A₂, wobei A₁ abnimmt. In den Fraktionen 32 bis 37 schließlich findet sich eine weitere deutliche Bande, die mit Bande B identisch ist (Abb. 7).

Nach Übertragung der Fraktionen mit den isolierten Hämocyaninbanden auf einen Rohrzuckergradienten und Zentrifugation wird Bande A in den oberen Fraktionen des Röhrchens (Fraktion 15-20) nachgewiesen, die Bande B

sedimentiert bis in die Fraktion 12 hinunter (Abb. 8).

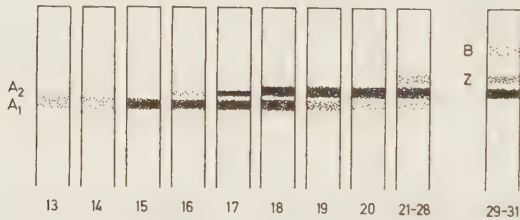
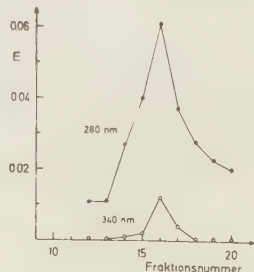
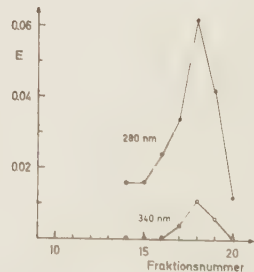


Abb. 7: Auftrennung der Hämolympheproteine von Cupiennius durch präparative Diskelektrophorese; analytische Diskelektrophorese der einzelnen Fraktionen.

Abb. 8:

Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Zentrifugation der durch präparative Diskelektrophorese isolierten Hämocyaninbänder in einem Rohrzuckergradienten; 0.4-1.0 M Saccharose, Tris/HCl-Puffer, pH 7.0, 39.500 rpm, 4 °C, 6 Std..

- a) 0.2 ml der Fraktion 15 (A₁-Bande);
- b) 0.2 ml der Fraktion 35 (B-Bande).



Umgekehrt läßt sich auch durch Zentrifugation im Rotor W 50 partiell getrenntes Hämocyanin durch präparative Diskelektrophorese nachreinigen.

Die präparative Diskelektrophorese stellt also eine Methode dar, die drei Hauptfraktionen B, A₁ und A₂ des Hämocyanins aus Cupiennius in einem Schritt isoliert zu gewinnen.

e) Auftrennung des Hämocyanins durch Isoelektrofokussierung: Isoelektrofokussierung erlaubt die analytische oder präparative Trennung von Ampholyten, besonders von Proteinen, entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt. Gleichzeitig ermöglicht sie die Charakterisierung von Ampholyten, besonders von Proteinen, durch die Bestimmung ihres isoelektrischen Punktes. Die isoelektrische Fokussierung zeichnet sich durch ein starkes analytisches Trennvermögen aus; Proteine mit einem Unterschied von 0.02 pH-Einheiten im isoelektrischen Punkt konnten erfolgreich getrennt werden (Übersicht: HAGLUND, 1972).

Hämolympe aus Cupiennius wurde zunächst durch Isoelektrofokussierung in einem pH-Bereich von pH 3.5-10 analysiert. Der Extinktionsverlauf, gemessen bei 280 nm und 340 nm (Abb. 9), zeigt zwei deutliche Maxima. Analytische Diskelektrophorese zeigt im ersten Maximum eine scharfe Bande, die A₂ entspricht. Im zweiten findet sich eine weitere deutliche Bande, die mit A₁ identisch ist. Ihr Anteil am Gesamtprotein beträgt für A₂ 49 % und für A₁ 51% (Abb. 10). Die Bande B trat nicht auf.

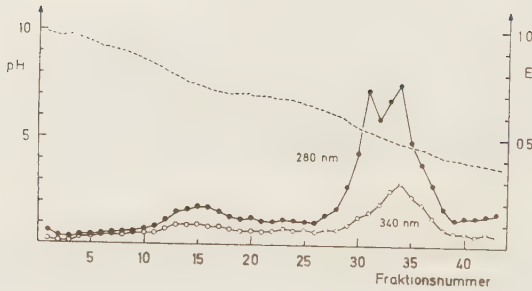


Abb. 9: Isoelektrofokussierung der Hämolympheproteine aus *Cupiennius* im pH-Bereich 3.5-10. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf des pH-Gradienten.



Abb. 10: Diskelektrophorese der durch Isoelektrofokussierung isolierten Banden; 5-proz. Gel, System 6 aus MAURER (1968), 300 V, 60 Min..

Bei der Isoelektrofokussierung wurde gleichzeitig der isoelektrische Punkt des Hämocyanins aus *Cupiennius* ermittelt: Er liegt für A_2 bei pH 5.35 (5.30 und 5.41)

und für A_1 bei pH 4.75 (4.71 und 4.80).

Bei trägerfreier Isoelektrofokussierung in einem Polyäthylenschlauch (MACKO und STEGEMANN, 1970) im pH-Bereich 4-6 (mit 1 % Ampholinlösung) wurde für A_2 ein isoelektrischer Punkt bei pH 5.39 und für A_1 bei pH 4.81 bestimmt.

Isoelektrische Fokussierung von Cupiennius-Hämolymphe in Polyacrylamid ergab zwei Banden mit einem I.E.P. von pH 4.75 (4.70, 4.75, 4.80) für die erste und pH 4.81 (4.77, 4.83, 4.85) für die zweite Bande. Ihr Anteil am Gesamtprotein beträgt für die erste Bande 44 % und für die zweite Bande 56 %. Die abweichenden Werte für den I.E.P. beruhen vermutlich auf fehlerhafter Messung des pH-Wertes im Gel.

Die durch Isoelektrofokussierung gefundenen Werte für den isoelektrischen Punkt des Cupiennius-Hämocyanins liegen gut im Bereich bekannter Daten. LOEWE (1972) fand bei Isoelektrofokussierung des Hämocyanins aus *Dugesia californica* einen isoelektrischen Punkt bei pH 5 (4.95 und 5.05). STEDMAN und STEDMAN (1926a) bestimmten für das Hämocyanin aus *Homarus vulgaris* den I.E.P. bei pH 4.95 und FEDERSEN (zit. von REDFIELD, 1934) für das Hämocyanin von *Astacus fluviatilis* einen I.E.P. bei pH 4.93.

Isoelektrophoretische Fokussierung stellt bisher die wirksamste Methode dar, A_1 und A_2 aufgrund verschiedener I.E.P.-Werte zu trennen. B ist hierbei vollständig dissoziiert. Nach LOEWE (1972) ist der Anteil der 24 S-Komponente (diese ist vermutlich identisch mit B) bei pH 5.8 (saurer Dissoziationsbereich) gering. Er beträgt 13 %. Es ist anzunehmen, daß bei weiterer Abnahme des

pH-Wertes bis zu pH 4.7 der Anteil der hochmolekularen Komponente auf Null zurückgeht.

3. Charakterisierung der reinen Hämocyaninkomponenten

a) UV-Spektren der Bande A₁ und A₂: Das Absorptionsspektrum zeigt für A₁ und A₂ den für Hämocyanine typischen Verlauf mit Maxima bei 278 nm und 340 nm. Das Maximum bei 560 nm wird aufgrund der starken Verdünnung nicht sichtbar. Die Maxima bei 278 nm und 340 nm verhalten sich bei A₁ wie 5:1 und bei A₂ wie 6:1 (Abb. 11).

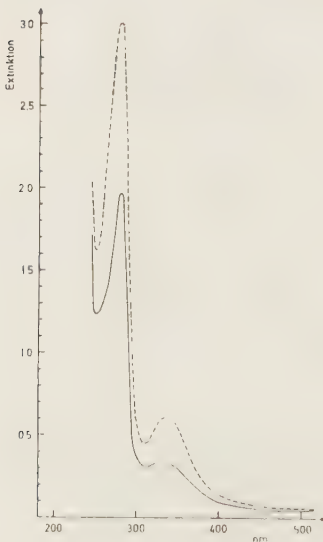


Abb. 11:

Absorptionsspektren der Hämocyaninkomponenten aus *Cupiennius*, gemessen bei Raumtemperatur; A₁-Bande (1.7 mg/ml), A₂-Bande (1.4 mg/ml).

Das Maximum bei 278 nm geht auf den Proteinanteil des Hämocyanins zurück. Für die Maxima bei 340 nm und 560 nm ist der oxygenierte Kupferkomplex verantwortlich.

Das Absorptionsspektrum der Gesamthämolymphe ist zum Vergleich in Abbildung 12 wiedergegeben.

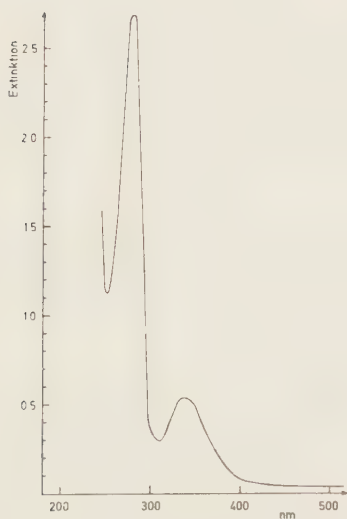


Abb. 12:

Absorptionsspektrum der Hämolymphe von Cupienus, gemessen bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:21).

Die Maxima bei 278 nm und 340 nm verhalten sich wie 5:1.

Für Gesamthämolymphe erscheint dieses Verhältnis der Maxima bei 278 nm und 340 nm zu niedrig: Das Absorptionsspektrum der Gesamthämolymphe stellt die Summe der Absorptionsspektren der Einzelkomponenten dar, sodaß ein Verhältnis der Maxima bei 278 nm und 340 nm von 5.3:1 zu

erwarten wäre.

b) Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten in der analytischen Ultrazentrifuge: Sedimentationsanalysen in der analytischen Ultrazentrifuge zeigen bei pH 7.0 für die Bande B einen Sedimentationskoeffizienten von 24 S und für die Bande A₁ und A₂ jeweils einen Sedimentationskoeffizienten von 13 S.

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten aus der Sedimentation im Sacharosegradienten ergibt für die Bande A einen Sedimentationskoeffizienten (nach Multiplikation mit den Korrekturfaktoren) von 15 S, für die Bande B von 18 S.

Die abweichenden Werte beruhen möglicherweise auf Fehlern in der Berechnung der Sacharosekonzentration in den einzelnen Fraktionen und daraus resultierenden Fehlern der Viskositäts- und Dichtewerte.

Die Proteinkomponenten von Cupiennius zeigen eine vom pH-Wert abhängige Dissoziation. Die Untersuchungen von LOEWE (1972) an der Gesamthämolymphe von Cupiennius zeigen, daß bei einem pH von 9.2, ohne Mg⁺⁺-Zusatz, die 16 S-Komponente mit 26 % und die 5 S-Komponente mit 73 % vorliegen, während die 24 S-Komponente vollständig dissoziiert ist. Es stellt sich nun die Frage, ob A₁ und A₂ im alkalischen Dissoziationsbereich unterschiedliches Dissoziationsverhalten zeigen oder ob es zur Ausbildung eines Gleichgewichtes kommt. Dazu wurden die Banden A₁ und A₂ zwei Tage lang gegen Na-Bicarbonatpuffer, Ionenstärke 0.1, pH 10.1, ohne Mg⁺⁺-Zusatz, dialysiert und anschließend in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. A₁ dissoziiert vollständig in eine 4 S-Kom-

ponente, A_2 zeigt dagegen zwei Komponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 13 S (28 %) und 5 S (72 %) (Abb. 13).



Abb. 13: Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten der Hämocyaninkomponenten aus *Cupiennius* in der analytischen Ultrazentrifuge nach alkalischer Dialyse; 44.000 rpm, 20 °C, UV-Scanner, Aufnahme nach 24 Min.. Die Abszisse gibt den Abstand vom Rotationszentrum, die Ordinate die Extinktion bei 280 nm an.
Oben: A_2 -Bande; unten: A_1 -Bande.

Es stellt sich die Frage, ob hier ein Gleichgewicht zwischen der 5 S- und der 13 S-Komponente vorliegt, oder ob es sich um zwei verschiedene Komponenten handelt.

Zur Trennung dieser 13 S- und 5 S-Komponente wurde durch Isoelektrofokussierung isoliertes A_2 -Protein auf eine Sephadex G-150-Säule aufgetragen, die mit dem gleichen alkalischen Puffer äquilibriert war (Abb. 14).

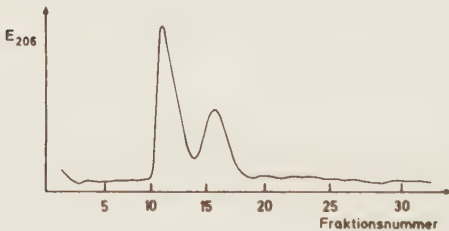


Abb. 14: Elutionsdiagramm des durch Isoelektrofokussierung isolierten A_2 -Proteins über Sephadex G-150. Elutionspuffer: Bicarbonatpuffer, $I = 0.1$, pH 10.1.

Sedimentationsanalyse in der analytischen Ultrazentrifuge ergab für das erste Maximum zwei Komponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 12 S (63 %) und 6 S (37 %). In der analytischen Diskelektrophorese werden die Bande A_2 (80 %) und eine schnell laufende Bande (20 %) sichtbar. In den Fraktionen des zweiten Maximums findet sich nur eine Komponente mit einem Sedimentationskoeffizienten von 4 S. Sie zeigt in der analytischen Diskelek-

trophorese zwei schnell laufende Banden.

Durch Chromatographie über Sephadex G-150 läßt sich also die Bande A_2 in eine vermutlich einheitliche Hämocyaninkomponente und in ein Fremdprotein, das im alkalischen Milieu in zwei Komponenten dissoziiert, aufspalten.

c) Demonstration eines Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichtes zwischen A_1 , A_2 und B: Die Untereinheiten von Arthropoden-Hämocyaninen stehen miteinander in einem Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht. Nach LOEWE (1972) zeigt das Hämocyanin von Cupiennius - ohne Zusatz von Mg^{++} - im pH-Bereich von pH 5.8 bis pH 9.05 drei Komponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 24 S, 16 S und 5 S, deren prozentualer Anteil am Gesamtprotein sich in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert. Aus Versuchen mit Mg^{++} -haltigen Hämocyaninlösungen, die in einer Verschiebung des pH-Stabilitätsbereiches in den alkalischen Dissoziationsbereich und einer Erhöhung des Anteils der höhermolekularen Komponenten resultieren, wird ersichtlich, daß der Dissoziationsvorgang stufenweise von der 24 S- zu der 16 S-Komponente erfolgt, die dann ihrerseits wieder in die 5 S-Einheiten dissoziiert (LOEWE, 1972).

Um zu prüfen, ob dieser Dissoziationsvorgang der 24 S-Komponente (identisch mit Bande B) zu der 16 S-Komponente (identisch mit den Banden A_1 und A_2) auch anhand des Bandenmusters nach elektrophoretischer Auftrennung in Polyacrylamidgel zu beobachten ist, wurden 10 μ l Cupiennius-Hämolymphe auf lange Gelröhrchen aufgetragen und im analytischen Diskelektrophoresesystem getrennt.

Anschließend wurden die Gele mit einer Rasierklinge in Längsrichtung halbiert und nach Anfärbung jeweils einer Gelhälfte entsprechende Gelabschnitte aus der unbehandelten Gelhälfte herausgeschnitten. Diese wurden in Veronalpuffer (0.01 M, pH 7.0) aufgenommen, homogenisiert, zentrifugiert, die Überstände vereinigt und nach 1-15 Tagen durch analytische Diskelektrophorese untersucht.

Die Banden A_1 und A_2 assoziieren nach drei Tagen zu 80 % zu B. Dieser Wert bleibt über den Zeitraum von 15 Tagen bis auf kleine Schwankungen, die auf Messungenauigkeiten beruhen, konstant.

Im Eluat der Bande B tritt nach drei Tagen eine Zwischenbande "Z" auf (6 % von B), die mit derjenigen Bande "Z" identisch ist, die auch bei Elektrophorese von unbehandelter Hämolymphe gelegentlich zwischen B und den A-Banden gefunden wird, aber immer nur schwach repräsentiert wird. Ihr prozentualer Anteil an B beträgt am 8. Tag 11 %, am 10. Tag 9 %.

Neben der Bande "Z" findet sich nach 11 Tagen eine A-Bande (zwei Versuche, je Versuch 1-3 identische Proben), deren elektrophoretische Beweglichkeit im Polyacrylamidgel zwischen denen der Bande A_1 und A_2 liegt. Dies erinnert an die Versuche, in denen die Banden A_1 und A_2 gemeinsam eluiert und reelektrophoretisiert wurden (s.S. 18).

Die analytische Diskelektrophorese der isolierten Banden B, A_1 und A_2 , in Zeitabständen von 0-15 Tagen, zeigt, daß B, A_1 und A_2 in einem Dissoziations-Assoziations-Verhältnis stehen. A_1 und A_2 bilden jeweils eine Bande B, die in der analytischen Diskelektrophorese einheitlich

wandert. Es stellt sich nun die Frage, ob A_1 und A_2 zu einer oder zu zwei B-Banden (entsprechend B_1 und B_2) reassoziieren. Bei einem Vorkommen von B_1 und B_2 müßten diese in ihrem elektrophoretischen Verhalten und ihrer Molekülgröße sehr ähnlich sein, da in der Diskelektrophorese nur eine B-Bande beobachtet wird.

Sedimentationsanalysen in der analytischen Ultrazentrifuge zeigen für die Bande "Z", nach Dialyse gegen Veronalpuffer (0.01 M, pH 7.0), einen Sedimentationskoeffizienten von 20 S (27 % des Gesamtproteins; Abb. 15).



Abb. 15:

Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten der Hämocyaninkomponenten aus *Cupiennius* in der analytischen Ultrazentrifuge; 40.000 rpm, 20 °C, UV-Scanner, Aufnahme nach 24 Min.. Die Abszisse gibt den Abstand vom Rotationszentrum, die Ordinate die Extinktion bei 280 nm an.

Oben: Hämolymphe, Verdünnung 1:60, dialysiert gegen 0.01 M Veronalpuffer, pH 7.0. Banden von links: - (nicht auswertbar), 15 S, 20 S ("Z"-Bande) und 22 S.

Unten: Hämolymphe, Verdünnung 1:81. Banden von links: 8 S, 15 S und 22 S.

Da nach Inkubation mit Na-Acetatpuffer (0.01 M, pH 5.3) für zwei Tage, bei Raumtemperatur, bei anschließender analytischer Diskelektrophorese die Bande "Z" deutlich sichtbar wird (14.6 % des Gesamtproteins), wurden diese Inkubationsbedingungen auf Sedimentationsanalysen in der analytischen Ultrazentrifuge übertragen. Neben einer 14 S-Komponente (70 % des Gesamtproteins) und einer 5 S-Komponente (30 % des Gesamtproteins) war jedoch eine höhermolekulare Komponente mit einem Sedimentationskoeffizienten zwischen 24 S (B-Bande) und 16 S (A-Banden), wie für die Bande "Z" nach ihrem Verhalten in der analytischen Diskelektrophorese zu erwarten wäre, nicht nachzuweisen. Die Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten der Bande "Z" beruhen möglicherweise auf den geringen Konzentrationen der Bande "Z".

4. Versuche zur Darstellung der kleinsten funktionellen Untereinheit

a) SDS-Gelelektrophorese: Nach WEBER und OSBORN (1969) ist die Trennung von Proteinen durch Polyacrylamidgелеlektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergens SDS nur von der Molekulargewichten ihrer Polypeptidketten abhängig. Werden die elektrophoretischen Beweglichkeiten gegen den Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen, so erhält man eine Gerade. Mit Hilfe bekannter Proteine als Eichsubstanzen lassen sich so die Molekulargewichte unbekannter Proteine bestimmen.

LOEWE (1972) hatte bereits einige Versuche zur Bestimmung des Molgewichtes der Polypeptidketten in Spinnenhämocyaninen unternommen und für die kleinste Komponente

von Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe ein Molekulargewicht von jeweils 85 000 Dalton gefunden.

Um die Größe der Polypeptidketten von Cupiennius-Hämocyanin zu untersuchen, wurden Molekulargewichtsbestimmungen unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen vorgenommen. Vorinkubation von Gesamthämolymphe aus Cupiennius mit 0.1 % SDS und 0.1 % β -Mercaptoäthanol für zwei Stunden bei 37 °C und anschließende analytische Diskelektrophorese mit SDS-haltigem Elektrodenpuffer ergab neben denaturiertem Protein am Kopf der Gelsäule drei intensiv gefärbte Banden, die in ihrer Gesamtmenge um 90 % des Gesamtproteins ausmachen und deren stärkste am schnellsten läuft (60 % Proteinanteil an den drei Banden; Abb. 16) (Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 45 °C bringt keine Veränderung des Bandenmusters).

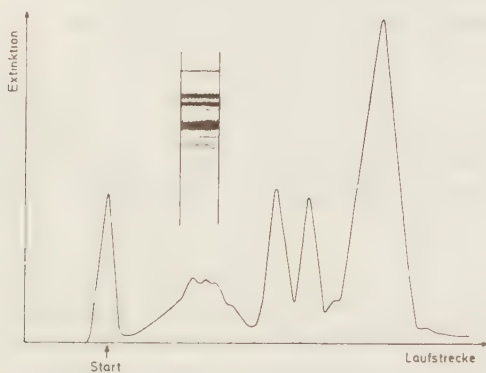


Abb. 16: Diskelektrophorese der Hämolympheproteine von Cupiennius unter Zusatz von SDS; 5-proz. Gel, System nach WEBER und OSBORN (1969), 8 mA/Gel, 4 Std..

Die Hauptbande hat ein Molekulargewicht von 75 000 $\pm$ 5000 Dalton und ist sicher identisch mit der 5-6 S-Komponente, die man bei Sedimentationsanalysen findet (LOEWE, 1972). Dieser für die kleinste Hämocyaninkomponente aus Cupiennius bestimmte Wert stimmt gut mit Werten überein, die von verschiedenen Autoren (s.u.) für andere Arthropoden-Hämocyanine gefunden wurden. Für die beiden langsamer wandernden Banden findet man Molgewichte von 105 000 $\pm$ 5000 und 125 000 $\pm$ 5000 Dalton. Nach 2 Stunden Inkubation mit SDS bei 37 °C und anschließender Dialyse gegen 0.01 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.0, 0.1 % SDS und 0.1 % β -Mercaptoäthanol wurden für die kleinste Komponente niedrigere Molgewichte bestimmt: 65 000 (1 Versuch) und 64 000 Dalton (2 Versuche). Dies läßt vermuten, daß eine verlängerte Vorbehandlung mit SDS und β -Mercaptoäthanol eine Konformationsänderung und eine damit verbundene größere Beweglichkeit im Gel der kleinsten Hämocyaninkomponente bewirkt.

Nach einer Verlängerung der Inkubationsdauer auf 24 und 48 Stunden bei Zimmertemperatur werden neben den drei, nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C gefundenen Banden sieben weitere Proteinbanden sichtbar, die niedrigere Molgewichte als 75 000 Dalton aufweisen.

b) Inkubation mit Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid:
Vorinkubation von Gesamthämolymphe aus Cupiennius mit 6 M Harnstoff in 0.01 M Veronal/Tris, pH 7.0, für zwei Stunden bei 37 °C und anschließende analytische Diskoelektrophorese in harnstoffhaltigem Veronalpuffer (5 mM, pH 7.0) ergibt vier schnell laufende Banden, wobei die schnellste als Doppelbande erscheint (Abb. 17).

Abb. 17:

Diskelektrophorese der Hämolympheproteine von *Cupiennius* unter Zusatz von Harnstoff; 5-proz. Gel, Inkubations- und Trenngelpuffer: 0.01 M Veronal, pH 7.0, 6 M Harnstoff, System nach WEBER und OSBORN (1969), 2.5 mA/Gel, 4 Std..

Nach Behandlung von Gesamthämolymphe mit Guanidiniumhydrochlorid (0.1-8.0 M) liegen 90 % des Gesamtproteins denaturiert am Kopf der Gelsäule vor. Daneben findet sich eine schnell laufende Bande, die 10 % des Gesamtproteins ausmacht.

c) Qualitative Analyse der N-terminalen Aminosäure:

Um zu prüfen, ob die Hämocyaninkomponenten A_1 und A_2 aus jeweils verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut sind, oder nur eine einzige Polypeptidkette aufweisen, wurde eine qualitative Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

durchgeführt. Gesamthämolymphe wurde als Vergleich eingesetzt.

Versuche zur qualitativen Bestimmung der N-terminalen Aminosäure durch Reaktion mit Dansylchlorid führten nicht zu deren Identifizierung.

Anwendung der Phenylisothiocyanat-Methode nach EDMAN (1950) ergibt dagegen für A₁, A₂ und Gesamthämolymphe jeweils Isoleucin als N-terminale Aminosäure (Abb. 18 und 19).



Abb. 18: Identifizierung der PTH-Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie; unten: Auftragungsstelle; aufgetragene Proben von links nach rechts:

1. Standard I (deutlich gefärbte Flecken in der Reihenfolge von unten nach oben: Asparagin, Serin, Methionin-Sulfonat, Glycin, Alanin, Prolin, Valin).
2. A₁-Bande, 2.7 mg/Ansatz.
3. Standard II (deutlich gefärbte Flecken in der Reihenfolge von unten nach oben: Glutamin, Threonin, Lysin, Tyrosin, Methionin, Leucin).

4. A₂-Bande, 1.9 mg/Ansatz.
5. Standard III (deutlich gefärbte Flecken in der Reihenfolge von unten nach oben: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin).
6. Cupiennius-Hämolymphe, 15 mg/Ansatz.
7. Standard I.
8. A₁-Bande, s.o..
9. Standard II.
10. Cupiennius-Hämolymphe, s.o..
11. Standard III.

System 1: Propionsäurebutylester (tert.).



Abb. 19: Identifizierung der PTH-Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie; System 2: Äthylenchlorid/Essigsäure (15:2).

Entgegen der Erwartung wird also nur eine N-terminale Aminosäure bei allen drei Präparationen gefunden. Dies ist im Falle von A₁ und A₂ zunächst ein Beweis für die Homogenität der Proben. Diesem Befund steht jedoch ent-

gegen, daß A₂, anhand von verschiedenen Kriterien (Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge nach alkalischer Behandlung und größeres Verhältnis von 280 zu 340 nm als A₁), einen Nicht-Hämocyaninanteil enthält, der somit dieselbe N-terminale Aminosäure wie Hämocyanin zu haben scheint.

Da das Hämocyanin aus *Cupiennius* 1 % Kohlenhydrat enthält, wurde auch geprüft, ob Aminosucker mit Dansylchlorid reagieren. Galactosamin und Glucosamin zeigen mit Dansylchlorid keine Reaktion.

D. D I S K U S S I O N

1. Darstellung von chemisch reinem, einheitlichem Hämocyanin

Das Muster der Proteine in der Hämolymphe

Analytische Diskelektrophorese in Polyacrylamid trennt die Hämolympheproteine von *Cupiennius* in drei Hauptfraktionen, die alle drei Peroxydaseaktivität aufweisen und funktionelles Hämocyanin bilden.

Sehr viel komplexere Bandenmuster wurden für Hämolympheproteine der Skorpione *Androctonus australis* L., *Androctonus mauretanicus* Pocock und *Androctonus amoreuxi* (GOYFFON et al., 1970) in Polyacrylamidgel gefunden. Das Elektropherogramm umfaßt 14 Kupferproteinfraktionen, von denen zwei Peroxydaseaktivität besitzen. Polyacrylamidgelelektrophorese der Hämolympheproteine der Rollassel *Porcellio laevis* L. zeigt in 7.5-prozentigem Gel 17, in 5-prozentigem Gel 11 Fraktionen (ALIKHAN und LYSENKO, 1973).

Es bestehen mehrere Unstimmigkeiten über die Bedeutung der vielfachen elektrophoretischen Banden. Die meisten Autoren setzen Heterogenität ihrer Hämocyaninpräparationen voraus. Alternativ werden diese Bandenmuster mit dem gleichzeitigen Vorkommen von Apohämocyanin in der Hämolymphe, mit der Bildung von Dissoziationsprodukten und mit den Wechselwirkungen des Hämocyanins mit verschiedenem Ionenmilieu erklärt.

Zunächst ist zu prüfen, inwiefern das elektrophoretische Bandenmuster vom Geschlecht oder physiologischen Zustand des Tieres abhängt, und wie stark es im Zusammenhang damit variiert.

Prüfung auf physiologisch bedingte Variabilität

Es wurde kein Protein gefunden, dessen Vorkommen an das Geschlecht gebunden ist. GOYFFON et al. (1970) fanden ebenfalls kein geschlechtsspezifisches Protein in der Hämolymphe der drei oben genannten Skorpione. HORN und KERR (1969) fanden dagegen bei dem Krebs *Callinectes sapidus* (Blue crab) ein sogenanntes "langsames" Hämocyanin nahezu ausschließlich in der Hämolymphe von Weibchen. Außerdem stellten sie in Weibchen mit reifenden Oocyten das Vorkommen eines sogenannten "high density" Lipoproteins fest. Es ist möglich, daß die Existenz von solchen geschlechtsspezifischen Proteinen mit einem besonderen physiologischen Zustand der Tiere verbunden ist. Ebenso können die Ernährung und der Lebensraum eine Rolle spielen. Zudem besteht die Möglichkeit, daß solche Proteine nur zu einer bestimmten Jahreszeit vorhanden sind.

Hämolymphe aus Weibchen von *Cupiennius*, welche kurz vor

der Eiablage standen oder gerade einen Kokon gesponnen und die Eier abgelegt hatten, zeigte bei analytischer Diskelektrophorese ebenfalls nur das charakteristische, bekannte Bandenmuster. Es wurden Hämolympheproben über den Zeitraum von etwa drei Jahren zu jeder Jahreszeit entnommen. Die verwendeten Tiere hatten ein Alter von 1-2 Jahren und wurden regelmäßig einmal pro Woche gefüttert. Änderungen der Ernährung (zweimal in der Woche oder vierzehntägig, doppelte Futtermengen) führten nicht zu einer Veränderung des Bandenmusters. Ebenso hatte die Jahreszeit, zu der die Hämolymphe entnommen wurde, keinen Einfluß auf das, nach analytischer Diskelektrophorese erhaltene Bandenmuster.

Weitere Argumente für das Auftreten multipler Hämocyanine bei Cupiennius

Für eine Erklärung des Bandenmusters aus den drei Proteinfraktionen der Hämolympheproteine von Cupiennius können Protein-Pufferwechselwirkungen ausgeschlossen werden, da das Bandenmuster bei Anwendung von verschiedenen Puffern (Veronal, Na-Phosphatpuffer und Ammoniumhydrogencarbonat) bei einem bestimmten pH-Wert unverändert bleibt. Es wurde auch kein Apohämocyanin gefunden, da alle Hauptfraktionen Kupferproteine sind (die Banden A_1 und A_2 zeigen jeweils ein Absorptionsmaximum bei 340 nm, für das der oxygenierte Kupferkomplex verantwortlich ist; die Bande B wird aus A_1 und A_2 reassoziert). Es wäre also denkbar, daß bei Cupiennius multiple Hämocyanine vorkommen. Es wäre dann zu erwarten, daß Fraktionen, die bei einem bestimmten pH-Wert erhalten wurden, bei erneuter elektrophoretischer Trennung unter den ursprünglichen Bedingungen ihr elektrophore-

tisches Verhalten nicht ändern. Dieses ist der Fall. Werden B, A₁ und A₂ einzeln ausgeschnitten und erneut elektrophoretisch getrennt, so zeigen sie das gleiche elektrophoretische Verhalten wie im ersten Lauf, und keine Fraktion ergibt (zumindest innerhalb eines kurzen Zeitraumes) eine der anderen Komponenten.

Daß das Bandenmuster aber zum Teil auf das Vorkommen von Dissoziationsprodukten mit unterschiedlichen Beweglichkeiten im Gel (aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen) zurückgeht, wird durch Versuche von LOEWE (1972) nahegelegt, nach denen das Hämocyanin von Cupiennius im Bereich zwischen pH 5.8 und pH 9.05 drei Komponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 24 S (40 % bei pH 7.0), 16 S (58 % bei pH 7.0) und 5 S (2 % bei pH 7.0) zeigt. Die Annahme wird bewiesen durch Versuche zur Reelektrophorese nach einem längeren Zeitraum. Nach drei Tagen wird neben den A₁- und A₂-Fraktionen die Komponente B sichtbar, die nach Sedimentationsanalysen in der analytischen Ultrazentrifuge das doppelte Molekulargewicht von A₁ bzw. A₂ hat.

Dialyse gegen EDTA

Dialyse der Hämolympheproteine von Cupiennius gegen EDTA-haltigen (5 mM, 10 mM oder 100 mM) Veronalpuffer bewirkt keine signifikante Verschiebung der prozentualen Anteile der einzelnen Hämocyaninkomponenten am Gesamtprotein. Erhöhung der EDTA-Konzentration resultiert in einer Abnahme des B-Proteins bei gleichzeitiger Zunahme der "Z"-Komponente. Ein Vergleich mit Werten, die nach Dialyse gegen Veronalpuffer ohne EDTA gefunden wurden, zeigt keine Konzentrationsverschiebung der einzelnen Kom-

ponenten. Mg^{++} -Ionen, die die Quartärstruktur des Hämocyanins beeinflussen, wurden also durch EDTA nicht besser (oder gar nicht) als durch Dialyse gegen Puffer ohne EDTA entfernt.

Die in Gegenwart von EDTA bei Elektrophorese gefundenen Werte stimmen annähernd mit den Werten überein, die LOEWE (1972) bei Sedimentationsanalysen (pH 7.0, ohne Mg^{++}) von Cupiennius-Hämocyanin findet: 40 % 24 S-, 58 % 16 S- und 2 % 5 S-Komponente, vorausgesetzt, daß die B-Fraktion mit der 24 S-Komponente und entsprechend die A_1 und A_2 -Fraktionen mit der 16 S-Komponente identisch sind. Nach CHANTLER (1973), der die Sauerstoffbindungs- und Aggregationseigenschaften des Hämocyanins von *Carcinus mediterraneus* und *Potamon edulis* in Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen oder EDTA untersuchte, beginnt in Gegenwart von EDTA (0.01 M und 0.02 M) die Dissoziation der 23 S- und 16 S- in die 5 S-Species im pH-Bereich 8-9, während bei Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen über den gesamten pH-Bereich 5.7-10.4 vorwiegend 23 S- und wenig 16 S-Partikel vorhanden sind.

"Alterung"

Neben der Proteinbande bei 278 nm zeigt das Absorptionsspektrum des Oxyhämocyanins von Cupiennius zwei sogenannte Kupferbanden bei 346 nm und 560 nm, die auf den Kupfer-Sauerstoff-Komplex zurückgehen. Die Bande bei 346 nm zeigt eine Extinktionsabnahme von 0.4 zu 0.325 nach 22 Tagen. Dieser Vorgang wird in der Literatur mit "Alterung" beschrieben. Bei entsprechenden Untersuchungen in der analytischen Diskelektrophorese wird keine quantitative Verschiebung und keine veränderte elektropho-

retische Wanderung der einzelnen Banden beobachtet.

Untersuchungen der Absorptionsspektren von α - und β - Hämocyanin bei *Helix pomatia* (HEIRWEGH und LONTIE, 1960; LONTIE und WITTERS, 1966) zeigten, daß die Extinktion der Kupferbanden Schwankungen unterworfen ist, die von den Präparationsbedingungen abhängen. Die Abnahme des spezifischen Extinktionskoeffizienten ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) der Kupferbande bei 346 nm beträgt für *Helix*-Blut nach dreimaliger Ammoniumsulfatfällung selbst am 25. Tag nur 6 %. Sie ist noch geringer nach Filtration des Blutes über Aktivkohle oder nach zweimaliger Zentrifugation bei 78 000 g und anschließender Dialyse gegen Wasser.

Entsprechende Beobachtungen wurden an Hämocyaninpräparationen von *Limulus polyphemus* gemacht (REDFIELD, zit. von HEIRWEGH und LONTIE, 1960). Danach zeigt Hämocyanin von *Limulus polyphemus* einen 30-prozentigen Abfall der Absorptionsbande im sichtbaren Bereich, verbunden mit einer 26-prozentigen Abnahme der Sauerstoffbindungskapazität.

Während das im Zuge der "Alterung" nicht veränderte Bandenmuster es für chemische Untersuchungen möglich macht, nicht nur frisches Hämocyanin, sondern auch länger aufbewahrte Proben zu verwenden, ist es für Untersuchungen der Sauerstoffbindungseigenschaften des Cupiennius-Hämocyanins jedoch notwendig, andere Aufbewahrungsbedingungen zu wählen als die, die in dieser Arbeit angegeben wurden.

2. Physikalische und chemische Charakterisierung der Banden

Sedimentationskoeffizienten

Sedimentationsanalysen in der analytischen Ultrazentrifuge ergeben bei pH 7.0 für die Bande B einen Sedimentationskoeffizienten von 24 S und für die Banden A₁ und A₂ jeweils einen Sedimentationskoeffizienten von 13 S. Diese Werte lassen sich gut mit den Werten von LOEWE (1972) vergleichen. LOEWE zeigte, daß Cupiennius-Hämocyanin im pH-Bereich von 5.8 bis 8.3 aus zwei Hauptkomponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 16 S und 24 S besteht. Im alkalischen Bereich kommt eine dritte Komponente mit einem Sedimentationskoeffizienten von 5 S hinzu, die ab pH 9.2 den größten Anteil des Gesamtproteins ausmacht, während die 24 S-Komponente ganz verschwindet.

Die 16 S- und 24 S-Komponenten sind ebenfalls die Hauptkomponenten der Crustaceen-Hämocyanine (Übersicht: FEYTMANS et al., 1966). Die 37 S-Komponente, die sich bei mehreren Skorpionen, bei *Limulus polyphemus* und bei den Spinnen *Nemesia cementaria* (FEYTMANS et al., s.o.), *Avicularia metallica* (VAN BRUGGEN in GHIRETTI, 1968) und *Dugesia californica* (LOEWE, 1972) findet, wurde im Cupiennius-Hämocyanin nicht nachgewiesen.

Sedimentationsanalysen im alkalischen Bereich. Zur Frage der Hämocyaninnatur der Banden A₁ und A₂.

Im allgemeinen dissoziieren Arthropoden-Hämocyanine bei erhöhten pH-Werten. Cupiennius-Hämocyanin zeigt in dieser

Beziehung ein typisches Verhalten: Sedimentationsanalysen zeigen, daß A_1 und A_2 im alkalischen Bereich (pH 10.1) in Untereinheiten zerfallen. A_2 ergibt zwei Komponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 13 S (28 %) und 5 S (72 %), während A_1 vollständig in eine 4 S-Komponente dissoziiert. Das wirft die Frage auf, ob A_2 überhaupt ein einheitliches Protein ist, ob es ein weiteres Protein als Verunreinigung enthält, oder ob es kein Hämocyanin ist, das aber in verschiedenen Experimenten durch Hämocyanin verunreinigt war.

Nach meiner Anschauung handelt es sich bei A_1 und A_2 um zwei verschiedene Hämocyanine. Es ist auszuschließen, daß das Ergebnis auf gegenseitigen Verunreinigungen beruht, da nur Fraktionen verwendet wurden, die nach Überprüfung in der analytischen Diskelektrophorese einheitliches A_1 - oder A_2 -Protein enthielten.

Zur Überprüfung der Frage, ob im Falle von A_2 ein Gleichgewicht zwischen der 13 S- und 5 S-Komponente vorliegt, oder ob es sich um zwei verschiedene Komponenten handelt, wurden diese durch Chromatographie über Sephadex G-150 getrennt. Die Sedimentationsanalyse in der analytischen Ultrazentrifuge ergab für das 13 S-Protein zwei Komponenten mit den apparenten Sedimentationskoeffizienten 12 S und 6 S (65 % des Gesamtproteins). Die 5 S-Komponente sedimentierte nach Sephadexchromatographie mit 4 S (Die angegebenen Sedimentationskoeffizienten sind nicht korrigiert und kennzeichnen damit die sedimentierenden Partikel nur ungefähr). Durch Chromatographie über Sephadex G-150 läßt sich also A_2 in eine vermutlich einheitliche Hämocyaninkomponente und in ein Begleitprotein, das erst nach längerer alkalischer Behandlung ein Gleichgewicht mit der entsprechenden

niedermolekularen Komponente ausbildet, aufspalten.

Durch Behandlung mit SDS und β -Mercaptoäthanol (MARKL, unveröffentlicht) läßt sich für die nach Sephadexchromatographie erhaltene 4 S-Komponente ein Molekulargewicht von 72 000 Dalton bestimmen. Diese scheint also nur noch aus einer Polypeptidkette zu bestehen, da diese Bande auch nach Anwendung stärker reduzierender und denaturierender Methoden bisher nicht weiter aufgetrennt werden konnte (MARKL, unveröffentlicht). Das aus A_2 nach alkalischer Behandlung abgetrennte 13 S-Protein ergibt nach SDS-Behandlung zwei hochmolekulare Banden mit 95 000 und 112 000 Dalton (MARKL, unveröffentlicht). Ein Vergleich mit den Hämolympheproteinen zweier Vogelspinnearten deutet an, daß diese Banden Polypeptidketten eines Begleitproteins darstellen (MARKL, unveröffentlicht).

Dieses Ergebnis zeigt, daß A_2 kein einheitliches Hämocyanin ist und ein weiteres Protein als Verunreinigung enthält. Diese Behauptung wird weiterhin durch folgende Argumente gestützt: Das Absorptionsspektrum zeigt für A_1 und A_2 den für Hämocyanine typischen Verlauf mit Maxima bei 278 und 340 nm. Das Verhältnis dieser Maxima ist bei A_2 stets höher als bei A_1 , d.h. daß die Extinktion bei 278 nm, die auf den Proteinanteil des Hämocyanins zurückgeht, bei A_2 durch ein weiteres Protein erhöht ist, während die Extinktion bei 340 nm, für die der oxygenierte Kupferkomplex verantwortlich ist, für A_1 und A_2 gleich groß wäre.

Bei Gesamthämolymphe ist das Verhältnis der Maxima von 278:340 nm (5:1) relativ niedrig. Dieses kann aber auf unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten in den

Präparationen beruhen, da diese eine Verschiebung des Quotienten zur Folge haben (LOEWE, 1972).

Bei der Isoelektrofokussierung des Hämocyanins aus Cupiennius wurde für A_2 ein isoelektrischer Punkt bei pH 5.35, für A_1 bei pH 4.75 bestimmt. Der Extinktionsverlauf (Abb. 9) zeigt für A_1 ein deutliches Extinktionsmaximum bei 340 nm. Dies spricht ebenfalls für die Vermutung, daß A_1 einheitliches Hämocyanin darstellt, während A_2 offenbar neben einer Hämocyaninkomponente einen Anteil eines weiteren Proteins enthält.

Die Möglichkeit, daß A_2 Fibrinogen enthält, wie es FULLER und DOOLITTLE (1971) in ungeronnener Hämolymphe von Panulirus interruptus fanden, ist nicht ausgeschlossen, da dieses Fibrinogen ein Molekulargewicht von 420 000 Dalton und einen I.E.P. um pH 5.0 aufweist. Bei analytischer Diskelektrophorese von geronnener und ungeronnener Cupiennius-Hämolymphe konnte allerdings kein Unterschied in dem für Cupiennius-Hämolymphe charakteristischen Bandenmuster festgestellt werden. Es ist somit unwahrscheinlich, daß eine Bande Fibrinogen darstellt oder enthält.

ROCHE und MONSIGNY (1974) isolierten aus gefrorener Hämolymphe des Xiphosuren Limulus polyphemus ein Lectin (Agglutinin), das bei Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid drei scharfe, eng beieinander liegende Banden mit einem I.E.P. bei pH 5.1 ± 0.1 ergibt. Dieser I.E.P.-Wert sowie der in Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, bestimmte Sedimentationskoeffizient $s_{20,w}^0$ von 13.9 S sind den Werten, die für A_2 -Protein der Cupiennius-Hämolymphe bestimmt wurden, sehr ähnlich. Allerdings sind die Molekulargewichte, die nach SDS-Behandlung und bei Analysen

in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt wurden, deutlich verschieden von den Werten, die von MARKL (unveröffentlicht) für A_2 -Protein gefunden wurden.

Die Möglichkeit, daß die A_2 -Bande ein kupferhaltiges Protein ist, das mit Hämocyanin nicht verwandt ist, ist ebenfalls nicht ausgeschlossen. LONTIE et al. (1962) fanden in der 21 S-Fraktion des *Helix-pomatia*-Blutes Protein, das nicht Hämocyanin darstellt; es weist einen sehr viel geringeren Kupfergehalt als Hämocyanin auf und verliert diesen Kupfergehalt bei Dialyse gegen EDTA. Hämocyanin-Kupfer wird bei Dialyse gegen EDTA nicht abgespalten.

Gegen den Einwand, daß A_2 nur Nicht-Hämocyanin darstellt, sprechen allerdings die Versuche, die ein Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht zwischen A_1 , A_2 und B zeigen: Werden A_1 , A_2 und B einzeln aus Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und nach 1-15 Tagen erneut elektrophoretisch getrennt, dann zeigt sich neben A_1 und ebenso neben A_2 die Bande B. Dieses Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht stellt sich sehr langsam ein. Auf die Gegenwart von zwei unterschiedlichen Hämocyaninen deuten auch frühere Versuche hin, bei denen zwei B-Banden (B_1 und B_2) sichtbar wurden, die sich deutlich mit o-Dianisidin anfärbten. Diese Trennungen konnten allerdings später nicht reproduziert werden.

Eine Wiedereinstellung des Gleichgewichtes zwischen den 25 S- und 17 S-Komponenten nach vorheriger Fraktionierung wird auch für *Homarus americanus*-Hämocyanin beschrieben (MORIMOTO und KEGELES, 1971). Im Gegensatz zu *Cupiennius*-Hämocyanin stellt sich das Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht beim Hummer-Hämocyanin sehr schnell ein.

3. Darstellung der kleinsten funktionellen Untereinheit

SDS-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgelelektrophorese in SDS ergibt für Cupiennius-Hämocyanin drei Banden (Verhältnis: 60:20:20) mit Molekulargewichten von 75 000, 105 000 und 125 000 Dalton. Der für die kleinste Hämocyaninkomponente aus Cupiennius bestimmte Wert von 75 000 Dalton stimmt gut mit Werten (74 000 - 84 000 Dalton) überein, die für Crustaceen-Hämocyanin gefunden wurden (LOEHR und MASON, 1973; CARPENTER und VAN HOLDE, 1973; STEWART et al., 1973; MURRAY und JEFFREY, 1974; ROXBY et al., 1974).

Im Gegensatz zu den von den oben zitierten Autoren bestimmten Werten stehen die Ergebnisse von RIZOTTI (1974). Er behauptet, daß die kleinste funktionelle Untereinheit von Carcinus maenas-Hämocyanin ein Aggregat aus 6 Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von jeweils 12 000 Dalton ist. Für die von LOEHR und MASON sowie von CARPENTER und VAN HOLDE bestimmten höheren Molekulargewichte wird von RIZOTTI unvollständige Dissoziation und Reaktion des Hämocyanins mit SDS, aufgrund zu kurzer Behandlung und/oder mit zu niedrigen SDS-Konzentrationen (niedriger als 1 %) während Elution und Elektrophorese verantwortlich gemacht.

Während Arthropoden-Hämocyanine im alkalischen Milieu in die kleinste Untereinheit zerfallen, konnten Mollusken-Hämocyanine dagegen bisher noch nicht ohne Spaltung kovalenter Bindungen soweit zerlegt werden. Die Werte für Molekulargewichte von Mollusken-Hämocyaninen nach SDS-Gelelektrophorese sind daher sehr viel höher: 265 000 Dalton für *Helix pomatia*-Hämocyanin (BROUWER

und KUIPER, 1973) und Molekulargewichte von 100 000 Dalton und höher für Hämocyanin aus der Schnecke *Murex trunculus* (WOOD und PEACOCKE, 1973).

SALVATO et al. (1972) versuchen eine Verbindung im Bauprinzip von Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanin herzustellen. Sie vertreten die Hypothese, daß Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine verwandte Proteine sind. Sie behaupten, daß die funktionelle Untereinheit des Mollusken-Hämocyanins (Beispiel: *Octopus vulgaris*) aus zwei Polypeptidketten von je 25 000 Dalton, die des Arthropoden-Hämocyanins (Beispiel: *Carcinus maenas*) aus drei Polypeptidketten von gleichem Molekulargewicht (25 000 Dalton) aufgebaut sind. Dieser Vorstellung liegt außerdem die Annahme einer "strukturellen" und zweier "funktioneller" Untereinheiten zugrunde, die aufgrund unterschiedlicher Ladung verschieden weit bei Diskoelektrophorese wandern müßten. Diese Vorstellung trifft für *Cupiennius*-Hämocyanin nicht zu, da es sich auch durch verlängerte SDS-Behandlung und nach Anwendung von Guanidiniumhydrochlorid nicht weiter als zu einer Polypeptidkette mit 75 000 Dalton spalten läßt. Auch wurde nach Zerlegung durch verschiedene Agentien niemals mehr als eine Bande beobachtet.

N-terminale Aminosäure

Anwendung der Phenylisothiocyanat-Methode nach EDMAN (1950) ergibt für A_1 , A_2 und Gesamthämolymphe jeweils Isoleucin als N-terminale Aminosäure. Dies ist im Fall von A_1 und A_2 zunächst ein Beweis für die Homogenität der Proben. A_1 und A_2 werden zudem offenbar nur aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebaut. Diesem Ergebnis steht jedoch entgegen, daß A_2 ein Begleitprotein ent-

hält, das somit zufällig dieselbe N-terminale Aminosäure wie Hämocyanin zu haben scheint. Obwohl die eingesetzten Konzentrationen der Hämolympheproteine an der unteren Nachweisgrenze dieser Methode liegen ($0.1 \mu\text{Mol}$), zeigen die Isoleucinflecken gleiche Intensität im UV-Licht wie der Isoleucinfleck ($10 \text{ nM}/2 \mu\text{l}$) des Referenzlösungsgemisches.

Eine Reihe von Versuchen zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure der Arthropoden- und Mollusken-Hämocyane wurden bisher unternommen. Verschiedene Ergebnisse, auch von gleichem Ausgangsmaterial, lassen vermuten, daß das Ergebnis stark von den Versuchsbedingungen abhängig ist.

Während COX et al. (1972) im Hämocyanin aus *Helix pomatia* keine N-terminale Aminosäure nachweisen konnten, bestimmten BROUWER und KUIPER (1973) im α -Hämocyanin aus *Helix pomatia* geringe Mengen N-terminales Isoleucin, die jedoch nicht den für eine Polypeptidkette von 265 000 Dalton erwarteten Betrag ausmachten. DIJK et al. (1970) wiesen in einer früheren Arbeit für *Helix pomatia*-Hämocyanin endständiges Arginin nach. Da beide Arbeitsgruppen für die qualitative Analyse der endständigen Aminosäure gleiche Bestimmungsmethoden anwenden, sind die unterschiedlichen Ergebnisse nicht zu erklären.

CARPENTER und VAN HOLDE (1973) bestimmten für Cancer magister-Hämocyanin N-terminale Asparaginsäure. STEWART et al. (1973) fanden für Hämocyanin des Flußkrebsses *Jasus lalandii* als einzige N-terminale Aminosäure Arginin.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Proteine in der Hämolymphe der Kammspinne *Cupiennius salei* wurden diskelektrophoretisch unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die drei Hauptfraktionen, die zusammen 91 % der Hämolympheproteine ausmachen, werden als A₁ (21 %), A₂ (23 %) und B (47 %) bezeichnet. Alle drei weisen Peroxydaseaktivität auf und erweisen sich damit als Hämocyanin.

Dieses charakteristische Bandenmuster aus drei Hauptfraktionen wurde bei Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme (0.01 M Veronal/Tris, pH 7.0, Na-Phosphatpuffer, pH 7.0 und 0.05 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7.9) beobachtet. Die Doppelbande A stellt also mit großer Wahrscheinlichkeit kein Artefakt dar.

In der Hämolymphe von adulten *Cupiennius*weibchen und -männchen wurde kein Unterschied im Bandenmuster gefunden. Hämolymphe aus *Cupiennius*weibchen vor oder nach Kokonbildung zeigte bei analytischer Diskelektrophorese ebenfalls keine zusätzlichen Banden. Es wurde kein Einfluß des Alters, der Ernährung und des physiologischen Zustandes des Versuchstieres auf das Bandenmuster beobachtet.

24-stündige Dialyse gegen EDTA (5 mM, 10 mM oder 100 mM) bewirkt keine signifikante Verschiebung der prozentualen Anteile der einzelnen Hämocyaninkomponenten am Gesamtprotein.

Bei Aufbewahrung der Hämolymphe von *Cupiennius* unter Luft hat wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe bei -17 °C keinen Einfluß auf die elektrophoretische Wanderung des Hämocyanins. Die Extinktion bei 346 nm

zeigt jedoch bei längerer Aufbewahrung eine Abnahme von 0.4 zu 0.325, sodaß man für Untersuchungen der Sauerstoffbindungseigenschaften des Cupiennius-Hämocyanins auf frisches Material angewiesen ist.

2. Zur Darstellung von chemisch reinem, einheitlichem Hämocyanin wurden verschiedene Methoden geprüft. Durch Zentrifugation in einem Rohrzuckergradienten von 0.4-1.0 M Sacharose in Tris/HCl, 0.05 M, pH 7.0, im Rotor SW 41 und anschließender Rezentrifugation im gleichen Gradienten läßt sich die Fraktion B von den A-Fraktionen trennen.

Präparative Diskelektrophorese (Veronal/Tris, 0.01 M, pH 7.0) führt zur Isolierung der Hauptfraktionen B, A₁ und A₂.

Isoelektrische Fokussierung stellt die wirksamste Methode dar, A₁ und A₂ isoliert zu gewinnen.

3. Das Absorptionsspektrum zeigt für A₁ und A₂ den für Hämocyanine typischen Verlauf mit Maxima bei 278 nm und 340 nm. Die Maxima verhalten sich bei A₁ wie 5:1, bei A₂ wie 6:1 und bei Gesamthämolymphe wie 5:1.

Sedimentationsanalysen in der analytischen Ultrazentrifuge zeigen bei pH 7.0 für die Bande B einen Sedimentationskoeffizienten von 24 S und für die Bande A₁ und A₂ jeweils einen Sedimentationskoeffizienten von 13 S.

Die Proteinkomponenten von Cupiennius zeigen eine pH-abhängige Dissoziation. Sedimentationsanalysen von A₁ und A₂ im alkalischen Dissoziationsbereich (pH 10.1) ergeben für A₂ zwei Komponenten mit den Sedimentations-

koeffizienten 13 S (28 %) und 5 S (72 %), während A_1 vollständig in eine 4 S-Komponente dissoziiert.

Isoelektrofokussierung des Hämocyansins aus Cupiennius ergibt für A_2 einen isoelektrischen Punkt bei pH 5.35 und für A_1 bei pH 4.75. B ist hierbei vollständig dissoziiert.

Als N-terminale Aminosäure wird für die Fraktionen A_1 und A_2 sowie für Gesamthämolymphe Isoleucin nachgewiesen.

4. Polyacrylamidgelelektrophorese in SDS zeigt für Cupiennius-Hämocyanin drei Banden (60:20:20) mit Molekulargewichten von 75 000, 105 000 und 125 000 Dalton. Die erste dieser Banden entspricht der funktionellen Untereinheit, die beiden anderen könnten auf ein Begleitprotein zurückgehen.

5. Die Untereinheiten von Cupiennius-Hämocyanin stehen miteinander in einem Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht. Die Banden A_1 und A_2 assoziieren nach drei Tagen zu 80 % zu B. Dieser Wert bleibt über den Zeitraum von 15 Tagen konstant. Im Eluat der Bande B tritt nach drei Tagen eine Zwischenbande "Z" auf (6 % von B). Neben dieser findet sich nach 11 Tagen eine A-Bande, deren elektrophoretische Beweglichkeit im Polyacrylamidgel zwischen denen der Bande A_1 und A_2 liegt.

6. Die Hämocyaninnatur der Banden A_1 und A_2 wird diskutiert.

F. L I T E R A T U R

- ALIKHAN, M.A. u. O. LYSENKO: Polyacrylamide gel electrophoresis of the haemolymph proteins in *Porcellio laevis* Latreille (Porcellionidae, isopoda): effect of age and imposed fasting. *Comp. Biochem. Physiol.* 45, 539-548 (1973).
- BRAMHALL, S., N.NOACK, M. WU u. J.R. LOEWENBERG: A simple colorimetric method für determination of protein. *Anal. Biochem.* 31, 146-148 (1969).
- BROHULT, S. u. K. BORGMAN: L'hemocyanine de *Helix pomatia*, est-elle composée de deux espèces de molécules? "The Svedberg 1884-1944", Almqvist und Wiksell, Uppsala und Stockholm, 429-437 (1944).
- BROSTEAUX, J.: Über den Einfluß der Ca- und Mg-Ionen auf die Stabilität des Hämocyanins. *Naturwissenschaften* 25, 249 (1937).
- BROUWER, M. u. H.A. KUIPER: Molecular-weight analysis of *Helix pomatia* α -haemocyanin in guanidine hydrochloride, urea and sodium dodecylsulfate. *Eur. J. Biochem.* 35, 428-435 (1973).
- CARPENTER, D.E. u. K.E. VAN HOLDE: Amino acid composition, amino-terminal analysis and subunit structure of Cancer magister hemocyanin. *Biochemistry* 12, 2231-2238 (1973).
- CHANTLER, E.N., R.R. HARRIS u. W.H.BANNISTER: Oxygenation and aggregation properties of haemocyanin from *Carcinus mediterraneus* and *Potamon edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 46, 333-343 (1973).

- COX, J., R. WITTERS u. R. LONTIE: The quaternary structure of *Helix pomatia* haemocyanins as determined by alkali treatment and succinylation. *Int. J. Biochem.* 3, 283-293 (1972).
- DE LEY, M. u. R. LONTIE: The preservation of haemocyanin under carbon monoxide. *FEBS Letters* 6, 125-127 (1970).
- DIJK, J., M. BROUWER, A. COERT u. M. GRUBER: Structure and function of hemocyanins. VII. The smallest subunit of α - and β -hemocyanin of *Helix pomatia*: size, composition, N- and C-terminal amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 221, 467-479 (1970).
- EDMAN, P.: Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283-293 (1950).
- ELIAS, H.G.: Ultrazentrifugen-Methoden. München: Beckman Instruments GmbH 1969.
- ELLERTON, H.D., D.E. CARPENTER u. K.E. VAN HOLDE: Physical studies of hemocyanins. V. Characterization and subunit structure of the hemocyanin of *Cancer magister*. *Biochemistry* 9, 2225-2232 (1970).
- FERNANDEZ-MORAN, H., E.F.J. VAN BRUGGEN u. M. OHTSUKI: Macromolecular organization of hemocyanins and apohemocyanins as revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 16, 191-207 (1966).
- FEYTMANS, E., M. WIBO u. J.V. BERTHET: Sedimentation constants of arthropod haemocyanins. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.* 74, 917-918 (1966).

- FULLER, G.M. u. R.F. DOOLITTLE: Studies of invertebrate fibrinogen. I. Purification and characterization of fibrinogen from the spiny lobster. *Biochem.* 10, 1305-1311 (1971).
- GAINER, H.: Isoelectric focusing of proteins at the 10^{-10} to 10^{-9} -g level. *Anal. Biochem.* 51, 646-650 (1973).
- GOYFFON, M., J. LAMY u. M. VACHON: Identification de trois espèces de scorpion du genre *Androctonus* à l'aide du protéinogramme de leur hémolymphe en gel de polyacrylamide. *Comptes Rendues* 270, 3315-3317 (1970).
- GRAY, W.R.: Dansyl chloride procedure. In: S.P. COLOWICK u. N.O. KAPLAN: *Methods in Enzymology*, Bd. XI, S. 139-151. New York: Academic Press 1967.
- HAGLUND, H.: Isoelectric focusing in pH gradients - A technique for fractionation and characterization of ampholytes. LKB-Produkter AB, Stockholm, Schweden, 1972.
- HALLER, W.: Chromatography on glass of controlled pore size. *Nature* 206, 693-696 (1965).
- HARTMAN, B.K. u. S. UDENFRIEND: A method for immediate visualization of proteins in acrylamide gels and its use for preparation of antibodies to enzymes. *Anal. Biochem.* 30, 391-394 (1969).
- HEIRWECH, K. u. R. LONTIE: Decrease of the copper bands of *Helix pomatia* haemocyanin. *Nature* 185, 854-855 (1960).

- HEIRWEGH, K., H. BORGINON u. R. LONTIE: Separation and absorption spectra of α - and β -haemocyanin of *Helix pomatia*. *Biochim. Biophys. Acta* 48, 517-526 (1961).
- HORN, E.C. u. M.S. KERR: The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus* - I. Hemocyanins and certain other major protein components. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 493-508 (1969).
- JOHNSTON, W., T.W. JAMES u. A.A. BARBER: Oxygen binding characteristics of lobster hemocyanin and its subunits. *Comp. Biochem. Physiol.* 22, 261-271 (1967).
- KERR, M.S.: Chromatographic isolation of crustacean hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.* 34, 301-308 (1970).
- LAMY, J., M. RICHARD u. M. GOYFFON: Sur les modifications des électrophorégrammes en gel de polyacrylamide des protéines de l'hémolymphe des scorpions *Androctonus australis* (L.) et *Androctonus mauretanicus* (Pocock), provoquées par la congélation. *Comptes Rendue* 270, 1627-1630 (1970).
- LOEHR, J.S. u. H.S. MASON: Dimorphism of Cancer magister hemocyanin subunits. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 51, 741-745 (1973).
- LOEWE, R.: Hämocyanin in der Hämolymphe zweier Spinnen, *Dugesia californica* und *Cupiennius salei* Keyserling. Dissertation, München 1972.

- LOEWE, R., B. LINZEN u. W. v. STACKELBERG: Die gelösten Stoffe in der Hämolymphe einer Spinne, *Cupiennius salei* Keyserling. Z. vergl. Physiol. 66, 27-34 (1970).
- LONTIE, R. u. R. WITTERS: *Helix pomatia* hemocyanins. In: Biochemistry of copper, p. 455-463. New York: Academic Press 1966.
- LONTIE, R., G. BRAUNS, H. COOREMAN u. A. VANCLEFF: Distribution of α - and β -hemocyanins in the blood of *Helix pomatia*. Arch. Biochem. Biophys. 1, 295-300 (1962).
- MACKO, V. u. H. STEGEMANN: Free electrofocusing in a coil of polyethylene tubing. Anal. Biochem. 37, 186-190 (1970).
- MANWELL, C. u. C.M.A. BAKER: Starch gel electrophoresis of sera from some marine arthropods: studies on the heterogeneity of hemocyanin and on a "ceruloplasmin-like protein". Comp. Biochem. Physiol. 8, 193-208 (1963).
- MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese. Berlin: Walter de Gruyter & Co 1968.
- MELCHERS, M.: Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei* (Keyserling), einer amerikanischen Ctenide. Zool. Jb., Abt. System., Ökol. und Geogr. 91, 1-90 (1963).
- MILLOT, J.: Contribution à l'histophysiologie des aranéides. Bull. biol. France Bel. 8, 1-238 (1926).

- MORIMOTO, H. u. G. KEGELES: Subunit interactions of lobster hemocyanin I. Ultracentrifuge studies. Arch. Biochem. Biophys. 142, 247-257 (1971).
- MURRAY, A.C. u. P.D. JEFFREY: Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Subunit heterogeneity. Biochemistry 13, 3667-3671 (1974).
- PETERSON, E.A. u. H.A. SOBER: Column chromatography of proteins: substituted celluloses. In: S.P. COLOWICK u. N.O. KAPLAN: Methods in Enzymology, Bd. V, S. 3-27. New York: Academic Press 1962.
- PROSSER, C.L. u. F.A. BROWN: Comparative animal physiology. Philadelphia: W.B. Saunders 1961.
- REDFIELD, A.C.: The hemocyanins. Biol. Revs. 9, 175-212 (1934).
- RIZZOTTI, M.: On the quaternary structure of *Carcinus maenas* (arthropoda) hemocyanin. Experientia 30, 1201-1202 (1974).
- ROCHE, A.-C. u. M. MONSIGNY: Purification and properties of limulin: a lectin (agglutinin) from hemolymph of *Limulus polyphemus*. Biochim. Biophys. Acta 371, 242-254 (1974).
- ROXBY, R., K. MILLER, D.P. BLAIR u. K.E. VAN HOLDE: Subunits and association equilibria of *Callinassa californiensis* hemocyanin. Biochemistry 13, 1662-1668 (1974).

- SALVATO, B., S. SARTORE, M. RIZZOTTI u. A. GHIRETTI-MAGALDI: Molecular weight determination of polypeptide chains of molluscan and arthropod hemocyanins. *FEBS Letters* 22, 5-7 (1972).
- STEDMAN, E. u. E. STEDMAN: Hemocyanin. Part II. The influence of hydrogen ion concentration on the dissoziation curve of the oxyhemocyanin from the blood of the common lobster (*Homarus vulgaris*). *Biochem. J.* 20, 938-948 (1926a).
- STEWART, L.B., J.S. FLEMING u. H.D. ELLERTON: Physical studies on the hemocyanin from *Jasus lalandii*. *Proc. Aust. Biochem. Soc.* 6, 23 (1973).
- STRAUCH, L.: Präparative Disk-Elektrophorese mit gesteuerter Elution. *Labo, Kennzifferzeitschrift für Labortechnik*, 1. Jahrgang, Heft 8 (1970).
- VAN BRUGGEN, E.F.J.: Electron microscopy of hemocyanins. In: *Physiology and biochemistry of haemocyanins* (F. Ghiretti ed.), p. 37-48. London and New York: Academic Press 1968.
- VAN BRUGGEN, E.F.J., V. SCHUITEN u. E.H. WIEBENGA: Structure and properties of hemocyanins III. Electron micrographs of hemocyanin from different gastropoda and crustacea. *J. Mol. Biol.* 7, 249-253 (1963).
- VAN HOLDE, K.E. u. L.B. COHEN: Physical studies of hemocyanins. I. Characterization and subunit structure of *Loligo pealei* hemocyanin. *Biochemistry* 3, 1803-1808 (1965).

- WEBER, K. u. M. OSBORN: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).
- WITTERS, R. u. R. LONTIE: Stability regions and amino acid composition of gastropod haemocyanins. In: Physiology and biochemistry of haemocyanins (F. Ghiretti ed.), p. 61-73. London and New York: Academic Press 1968.
- WOOD, E.J. u. A.R. PEACOCKE: Murex trunculus haemocyanin. 1. Physical properties and pH-induced dissociation. Eur. J. Biochem. 35, 410-420 (1973).

LEBENS LAUF

Ich wurde am 9. Mai 1947 als jüngste Tochter des Chemikers und Diplom-Kaufmannes Dr. Friedrich Tiedt in Otterndorf, Kreis Hadeln, geboren. Im Herbst 1953 wurde ich in Landshut, Niederbayern, eingeschult; dort kam ich nach vier Volksschuljahren an das Realgymnasium Seligenthal. 1959 siedelten wir nach Berlin über. Dort besuchte ich die Gertraudenschule in Zehlendorf. Drei Jahre später verließ ich diese Schule wieder, um aufgrund einer beruflichen Veränderung meines Vaters nach Kamen in Westfalen zu ziehen. Dort absolvierte ich an dem städtischen, neusprachlichen Gymnasium zu Ostern 1966 das Abitur. Zum Sommersemester 1966 schrieb ich mich an der Universität München ein, an der ich im Sommersemester 1968 die Prüfung für das Vordiplom (Zoologie, Botanik, Genetik, Chemie) sowie im Sommersemester 1971 die Prüfung für das Hauptdiplom (Zoologie, Botanik, Biochemie, Anorganische Chemie) ablegte. Im November 1971 beendete ich die Diplomarbeit (Thema: "Untersuchungen zum Tryptophanabbau in der Entwicklung von *Gryllus bimaculatus* de Geer") und begann die vorliegende Promotionsarbeit. Ich bin seit 1973 verheiratet.

